

E²⁶Fe²⁶ctos Sublet¹³Al¹³es de la Expo¹⁴Si¹⁴ción
al Ver²²Ti²²do Tóxico de A³⁰Zn³⁰alcóllar
en Ave¹⁶S¹⁶ de Larga ²³V²³ida



TESIS DOCTORAL

Raquel Baos Sendarrubias





Efectos Subletales de la Exposición al Vertido Tóxico de Aznalcóllar en Aves de Larga Vida

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2015

A mi familia



Estación Biológica de Doñana (CSIC)
Departamento de Biología de la Conservación



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias, Departamento de Ecología

Efectos subletales de la exposición al vertido tóxico de Aznalcóllar en aves de larga vida

Memoria presentada por **Raquel Baos Sendarrubias**
para optar al Grado de Doctora en Biología

Vº Bº del Director:

Vº Bº del Tutor:

Fdo.: Prof. Dr. Fernando Hiraldo Cano
Estación Biológica de Doñana (CSIC)

Fdo.: Dr. Carlos Montes del Olmo
Universidad Autónoma de Madrid



"From the corner of her eye, Theo Colborn caught sight of another scientific paper shooting across the floor and settling on the carpet. She didn't even bother to turn her head. In hopes of slowing the tide of paper that was swamping their office in the fall of 1987, she had taken to closing her door, but it had done little good. With the wrist action of a Frisbee champion, the project director simply flicked them under the door. He had become so adept, he could wing a document to the center of the office. She let it sit there.

Flick. Another. Flick. Flick. Two more.

*Sometimes, half a dozen documents would arrive in a single hour. She barely had time to file the reports and papers that bore titles such as "A Quantitative Assessment of Thyroid Histopathology of Herring Gulls (*Larus argentatus*) from the Great Lakes and a Hypothesis on the Causal Role of Environmental Contaminants", much less read them. Colborn looked around at the listing stacks of reports and studies and the bulging cardboard file boxes spread across the floor. So much had accumulated since she had begun her review of scientific papers concerning the health of wildlife and humans in the Great Lakes region that the place was beginning to look like a landfill. If it got much worse, she would have to apply for a permit. Working late into the evening and on weekends had not solved the problem. As hard as she was scrambling, she felt as if she were getting buried.*

How was she ever going to make sense of all this stuff?"

"Our Stolen Future"

Theo Colborn, Dianne Dumanoski, & John Peterson Myers, 1997.



ÍNDICE

15 / INTRODUCCIÓN GENERAL

- 17 / ACCIDENTES MEDIOAMBIENTALES. EL VERTIDO TÓXICO DE AZNALCÓLLAR
- 18 / CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS Y METALOIDES
 - 21 / EFECTOS SUBLETALES
 - 22 / BIOMARCADORES
- 27 / ESPECIES CENTINELAS. LAS AVES COMO BIOINDICADORES AMBIENTALES
 - 30 / OBJETIVOS Y ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS
 - 32 / REFERENCIAS

39 / MÉTODOS GENERALES

- 41 / ÁREA DE ESTUDIO
- 53 / ESPECIES Y POBLACIONES ESTUDIADAS
 - 57 / TRABAJO DE CAMPO
 - 59 / CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS
 - 66 / REFERENCIAS

71 / CAPÍTULO 1

/ IMMUNE RESPONSE AND HEAVY METALS IN BIRDS

87 / CAPÍTULO 2

/ GENOTOXIC EFFECTS OF HEAVY METALS IN BIRDS

105 / CAPÍTULO 3

/ ENDOCRINE PARAMETERS AND HEAVY METALS IN STORKS

121 / CAPÍTULO 4

/ DISRUPTED BONE METABOLISM IN CONTAMINANT-EXPOSED STORKS

137 / CAPÍTULO 5

/ DEVELOPMENTAL EXPOSURE TO POLLUTANTS AND FITNESS

153 / SÍNTESIS

- 155 / DISCUSIÓN GENERAL
- 170 / CONSIDERACIONES FINALES
- 179 / RECOMENDACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES
- 187 / REFERENCIAS

195 / CONCLUSIONES

201 / AGRADECIMIENTOS

INTRODUCCIÓN GENERAL



ACCIDENTES MEDIOAMBIENTALES. EL VERTIDO TÓXICO DE AZNALCÓLLAR

Los accidentes medioambientales se han convertido en una triste realidad que de cuando en cuando ocupa la primera página de los periódicos y es cabecera de las noticias de radio y televisión. Explosiones o escapes químicos como los de Seveso (Italia, 1976), o Bhopal (India, 1984), radioactivos como el de Chernobyl (Ucrania, 1986) o Fukushima (Japón, 2011), o los más frecuentes vertidos de crudo como los del petrolero Exxon Valdez (Alaska, USA, 1989), del Prestige (España, 2002) o la plataforma petrolífera Deepwater Horizon-BP (Golfo de México, USA, 2010), son una de las consecuencias de la mala gestión de riesgos que caracteriza a la sociedad industrial y tecnológica en la que vivimos. El ser humano se halla detrás de la gran mayoría de estos desastres, que suelen recibir precisamente este nombre (desastres) por el impacto obvio e inmediato que ocasionan allí donde se producen. Así, es frecuente ver imágenes de paisajes devastados, de voluntarios y técnicos limpiando zonas cubiertas de petróleo o lodos tóxicos y leer noticias donde se detalla el número o cantidad de animales muertos o las dimensiones de la superficie afectada, por lo general, muy elevados. Sin embargo, después de algunas semanas, meses o, en el mejor de los casos, años, los medios de comunicación y con ellos la administración competente suelen olvidarse de esos accidentes/desastres y de los efectos directos o indirectos que, más allá del llamativo impacto inicial (p.ej., grandes mortandades de peces y aves), pueden tener a medio-largo plazo sobre la fauna en particular y el ecosistema en general, y que muchas veces son más importantes para la dinámica de las poblaciones y ecosistemas afectados que los efectos a corto plazo (Guterman 2009; Peterson et al. 2003).

El vertido de la mina de pirita de Aznalcóllar (Sevilla), propiedad de la empresa sueco-canadiense Boliden-Apirsa S.L., se produjo en la madrugada del 25 de abril de 1998, cuando en el muro de la balsa de residuos tóxicos procedentes de la flotación de este mineral de hierro se abrió una brecha de 50 m de altura y 14 m de profundidad. Tras la rotura del muro, seis millones de metros cúbicos de lodos y aguas ácidas con una alta concentración de metales pesados provocaron una excepcional riada, desbordando los ríos Agrio y Guadiamar a lo largo de 63 km de cauce y afectando una superficie de 4634 ha (Grimalt et al. 1999). La riada alcanzó más de tres m de altura en algunos puntos, llegando hasta el mismo límite del Parque Nacional de Doñana. Más de 37 toneladas de peces y 170 kg de cangrejo rojo muertos se recogieron en los cauces de estos ríos. La mortalidad de la fauna del terreno aluvial fue menor gracias a su movilidad, pero fue necesario recoger 890

huevos y decenas de pollos de aves que en ese momento se encontraban en fase de reproducción, y que de otro modo hubieran perecido. La magnitud del vertido y el hecho de que se produjera en una zona tan importante para la conservación del patrimonio natural como el entorno del Parque Nacional de Doñana lo convirtieron en el desastre medioambiental más importante ocurrido en España hasta esa fecha y uno de los más graves acaecidos en Europa (Blasco & Del Valls 2005; Grimalt & Macpherson 1999; Pain et al. 1998).

La composición química del vertido era mayoritariamente de metales pesados (y metaloides), con la presencia de casi un tercio de los elementos químicos conocidos. Las cantidades estimadas en los lodos tóxicos para algunos de los elementos vertidos eran del orden de las 16 000 toneladas de cinc (Zn) y plomo (Pb), 10 000 toneladas de arsénico (As), 4000 toneladas de cobre (Cu), 1000 toneladas de antimonio (Sb), 120 toneladas de cobalto (Co), 100 toneladas de talio (Tl) y bismuto (Bi), 50 toneladas de cadmio (Cd) y plata (Ag), 30 toneladas de mercurio (Hg), y 20 toneladas de selenio (Se) y otros metales. Entre un 5% y un 15% de estos metales/metaloides se infiltraron en el suelo, y los procesos de oxidación aumentaron su movilidad y biodisponibilidad para las cadenas tróficas (Grimalt et al. 1999). Aunque las tareas de limpieza se iniciaron sólo ocho días después de que ocurriera el vertido, acometiéndose en un tiempo récord de siete meses en una primera fase (con la retirada de siete millones de metros cúbicos de lodos y tierras contaminadas) y dándose finalmente por concluidas en el año 2000 (tras una segunda limpieza en varios tramos del río Guadiamar y la zona de Entremuros), los estudios llevados a cabo en los meses siguientes al vertido mostraron que los metales habían entrado en las cadenas tróficas de Doñana (Grimalt & Macpherson 1999), llegando a sus eslabones más altos representados por algunas especies de aves como la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) o el milano negro (*Milvus migrans*) (Benito et al. 1999; Hernández et al. 1999).

CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS Y METALOIDES

Los metales constituyen una gran familia de elementos caracterizados por una química compleja. Algunos de ellos, los llamados “esenciales”, son necesarios para el normal funcionamiento de los seres vivos y forman parte de aminoácidos, ácidos nucleicos y otros componentes estructurales del organismo. El Zn, por ejemplo, es un componente esencial de al menos 150 enzimas, el Cu es fundamental para el normal funcionamiento de la citocromo c oxidasa y el hierro (Fe) forma parte de la hemoglobina. Todos los metales esenciales poseen un rango de variabilidad (“ventana de esencialidad”) dentro del cual sus concentraciones han de mantenerse

constantes para que el organismo crezca y se reproduzca normalmente. Para algunos de ellos ese rango es muy reducido (p.ej., el Se), de forma que fuera de esos márgenes, y superada la capacidad homeostática del organismo, esos mismos metales esenciales pueden dar lugar a efectos adversos. Otros metales como el Cd, el Hg, el Pb o el metaloide As se consideran no esenciales porque no desempeñan función alguna conocida en los organismos vivos. Además de ser tóxicos por encima de ciertos niveles o umbrales de toxicidad, los metales no esenciales como el Hg o el Cd, pueden también afectar negativamente a los organismos induciendo deficiencias de elementos esenciales al competir con ellos por los sitios activos en importantes biomoléculas (Goyer 1997; Walker et al. 2001). En este sentido es importante señalar que, en su mayor parte, los metales no se hallan en el medio aisladamente, sino que coexisten en mezclas con otros metales/metaloides y/o sustancias de naturaleza orgánica con las que pueden interaccionar dando lugar a efectos distintos a los que ocasionarían de manera individual o aislada (ATSDR 2004). Los efectos de los metales en las mezclas pueden ser aditivos, sinérgicos, antagónicos, o incluso potenciadores (la presencia de un determinado metal en una mezcla puede actuar de “catalizador” de otro metal también presente en ella, desencadenando una serie de efectos que de forma aislada no ocasionaría). Estas interacciones también pueden aparecer entre elementos esenciales y, en cualquier caso, dificultan el estudio de los efectos observados.

A diferencia de otros contaminantes que no existen en el medio de forma natural sino que han sido creados por el hombre con un determinado fin (p.ej., los pesticidas organoclorados), o que resultan de la degradación de estos otros como *by-products* o productos secundarios, los metales son elementos naturales, liberados al medio tras la alteración de sus ciclos (bio)geoquímicos, por causa tanto de la actividad humana como de procesos naturales (p.ej., las erupciones volcánicas o la erosión del suelo). La actividad minera (extracción y procesamiento de minerales), la combustión de carbón y petróleo, la incineración de residuos, y el uso agrícola de los fangos procedentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales constituyen importantes fuentes de contaminación por metales, a las que hay que añadir el uso agrícola de determinados fertilizantes y pesticidas con una base metálica (p.ej., arsenato de plomo), o en el caso de determinados metales como el Pb, usos específicos como la actividad cinegética con munición de este metal (Pattee & Pain 2003; Walker et al. 2001). Debido a que, en general, la vida media de los metales en el ecosistema es larga, y aunque su estructura puede ser modificada en el medio o en el interior de los organismos vivos por causa de la especiación u otros procesos tales como ionización o metilación, los metales son clasificados como contaminantes persistentes. Además, el hecho

de que su uso esté muy extendido en la fabricación de una gran cantidad de productos hace que la contaminación por metales se considere ubicua (Walker et al. 2001).

La principal ruta de exposición de la fauna a la contaminación por metales/metaloideos (de aquí en adelante metales *sensu lato*), sobre todo en el medio terrestre, es la dieta que, en determinados casos, y normalmente vinculado a los hábitos tróficos o formas de alimentarse, puede ir acompañada de la ingestión accidental de suelo/sedimento y/o agua contaminada. En menor medida los metales se incorporan al organismo por inhalación. El grado de exposición depende de factores tales como la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad (Fairbrother et al. 2007). A diferencia de otro tipo de contaminantes, los metales se bioacumulan pero no se biomagnifican a través de la cadena trófica, excepto ciertos compuestos organometálicos como el metil-mercurio, que puede biomagnificarse varios órdenes de magnitud dentro del medio acuático.

Una vez en el interior del organismo, la vida media de los metales varía en función del elemento y de la especie/taxón afectada. Por ejemplo, en mamíferos, la vida media del Cd es de entre 20 y 30 años mientras que la del As o el cromo (Cr) es sólo de algunas horas o días. Su toxicidad depende no sólo de la dosis y del tiempo de exposición, como ocurre en el caso de otros contaminantes, sino también de la forma (especie) química en que se encuentre y de su biodisponibilidad, además de la susceptibilidad/sensibilidad del individuo (o especie/taxón) expuesto, relacionada esta con una serie de factores (*host-factors*) tales como el tamaño, la edad, el sexo, el estado nutricional, la fase del ciclo vital o estatus (p.ej., reproductor o no reproductor) y sus características genéticas (p.ej., polimorfismos) (Burger et al. 2003; Peakall & Burger 2003). Así, se han detectado efectos adversos en individuos en desarrollo (p.ej., pollos) expuestos a niveles que resultan inocuos para los adultos de la misma especie y/o población (Burger et al. 2003; Gochfeld 1997; Scanes & McNabb 2003).

En esta tesis se analizan la exposición y potenciales efectos biológicos ocasionados por cinco metales, dos de ellos esenciales, Cu y Zn, y tres no esenciales, Pb, Cd y As en dos especies de aves, la cigüeña blanca y el milano negro (ver apartado *Objetivos y Estructura General de la Tesis*). Estos metales, además de ser los más abundantes en el vertido de Aznalcóllar (Grimalt et al. 1999), son los que se detectaron mayoritariamente en las cadenas tróficas de Doñana en los estudios de exposición a corto plazo realizados dentro del programa de seguimiento de seres vivos en el que se enmarcó esta tesis establecido a los pocos días del accidente (Grimalt & Macpherson 1999). En el caso específico de las aves, inicialmente también se midieron las concentraciones de Sb, Tl, Co y Hg en diversos tejidos (Benito et al. 1999; Hernández et al. 1999; datos inéditos), sin

embargo, sus niveles fueron generalmente inferiores a los límites de detección de las metodologías empleadas para su cuantificación, por lo que se decidió excluirlos de esta tesis y del programa de seguimiento. Estudios llevados a cabo de forma paralela y complementaria a esta tesis en algunas especies de aves como la cigüeña blanca, han servido para analizar la exposición a otros elementos [p.ej., Cr, bismuto (Bi), vanadio (Va), estroncio (Sr), bario (Ba), o azufre (S), entre otros], si bien los niveles encontrados no fueron en ningún caso merecedores de un seguimiento continuado o de una investigación más detallada (Smits et al. 2005).

EFFECTOS SUBLETALES

Los metales se han asociado tradicionalmente con una gran variedad de efectos adversos para la salud [EPA's Integrated Risk Information System (IRIS); Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR); World Health Organization's International Programme for Chemical Safety (WHO/IPCS)]. Algunos son conocidos mutagénicos, carcinogénicos, e incluso teratogénicos (Rojas et al. 1999), pero sus efectos también pueden ser neurológicos, cardiovasculares, hematológicos, gastrointestinales, musculoesqueléticos, inmunológicos, etc. (Berglund et al. 2000; Fairbrother et al. 2007; Florea & Buesselberg 2006). Esta diversidad en cuanto a toxicidad que, además, puede ser multiorgánica (i.e., afectar a varios órganos o sistemas simultáneamente), es probablemente un reflejo de la variedad de mecanismos a través de los cuales los metales pueden ejercer efectos adversos (a diferencia de, por ejemplo, algunos contaminantes orgánicos como los pesticidas organofosforados o los carbamatos, caracterizados por unos mecanismos de acción bien definidos).

La bibliografía sobre los efectos adversos de los metales en fauna silvestre es amplia, sobre todo para algunos elementos como el Pb o el Hg (p.ej., Pattee & Pain 2003; Scheuhammer 1987). Estos efectos abarcan desde la muerte del animal (efectos letales), generalmente asociada a una intoxicación aguda (exposición a concentraciones elevadas durante un período de tiempo corto), hasta sutiles cambios bioquímicos, celulares, fisiológicos e incluso de comportamiento (efectos subletales). Los efectos subletales son mucho más frecuentes en la naturaleza y también más preocupantes por su repercusión en la viabilidad de las poblaciones silvestres (Banks & Stark 1998; Scheuhammer 1987), aunque faltan estudios detallados a este respecto. Los efectos subletales suelen derivar de la exposición prolongada a niveles de contaminantes que se sitúan por debajo del umbral de toxicidad (niveles subletales). Aunque normalmente no conllevan la

muerte del animal, sí son capaces de alterar su fisiología (y/o comportamiento), afectando a la salud del individuo y con ello a su eficacia biológica o *fitness* (i.e., reproducción y supervivencia). Pese a que las concentraciones de metales en el vertido de Aznalcóllar fueron muy elevadas, los estudios llevados a cabo sobre ejemplares recolectados inmediatamente después del accidente mostraron que los niveles alcanzados en los tejidos de la mayor parte de las especies de aves estudiadas fueron subletales (Benito et al. 1999; Hernández et al. 1999; Taggart et al. 2006).

Especial atención han recibido en los últimos años los efectos subletales que los contaminantes ejercen sobre la reproducción, tanto a corto como a medio y largo plazo (Bustnes et al. 2003, 2007; Evers et al. 2008; Fry 1995; Grasman et al. 1998; Helberg et al. 2005; Hose & Guillette 1995; Spahn & Sherry 1999). Sin embargo, son los efectos a largo plazo los que plantean mayores incógnitas, sobre todo cuando la exposición a los contaminantes tiene lugar durante la fase de desarrollo, ya que pueden provocar efectos latentes no detectables hasta que los individuos afectados alcanzan la madurez reproductora (Colborn & Clement 1992; Dickerson & Gore 2007; Di Giulio & Tillit 1999; Fernie et al. 2001, 2003; Iwaniuk et al. 2006; Quinn et al. 2008). Entender cómo afectan estos efectos subletales a la salud/dinámica de las poblaciones es de suma importancia para valorar el impacto de los contaminantes sobre el medio, y poder utilizarlos como señal de alerta temprana.

BIOMARCADORES

Una herramienta de uso extendido en el estudio de los efectos subletales son los llamados biomarcadores (Fossi & Leonzio 1994; Fox 1993). Se puede definir biomarcador como cualquier cambio o respuesta a nivel bioquímico, celular, fisiológico o de comportamiento susceptible de ser medido en un organismo vivo (respuesta biológica) que evidencie la exposición y/o efecto tóxico de uno o más contaminantes (Fossi & Leonzio 1994; McCarthy & Shugart 1990; Peakall 1994).

Aunque en la bibliografía se pueden encontrar varias clasificaciones según los autores (ver, p.ej., Depledge 1994; Forbes et al. 2006; Fox 1993; Hagger et al. 2006; Peakall & Walker 1994), en general, los biomarcadores se suelen dividir en biomarcadores de exposición y biomarcadores de efecto (Fossi & Leonzio 1994). Los primeros son aquellos cambios o respuestas biológicas que indican exposición a una sustancia química o clase de sustancia pero que no proporcionan información acerca de los efectos tóxicos que ocasionan en el organismo (p.ej., inducción de

metalotioneinas). Los biomarcadores de efecto indican tanto la exposición a un químico como su efecto tóxico (p.ej., inhibición de acetilcolinesterasa), aunque no necesariamente aportan datos sobre la naturaleza del contaminante (p.ej., inducción de proteínas de estrés).

Tal y como se mencionaba en la definición, estas respuestas pueden producirse a diferentes niveles de organización biológica o complejidad estructural, desde el genético o molecular, hasta el nivel de organismo. No obstante, hay autores que consideran también algunas respuestas a nivel de población, comunidad, e incluso de ecosistema como biomarcadores (p.ej., riqueza y diversidad de especies) (Clements 2000; Peakall & Walker 1994).

A nivel de individuo, y junto con el análisis de residuos en tejidos biológicos, los biomarcadores proporcionan un sistema integrado para evaluar la biodisponibilidad, bioacumulación y efectos de los contaminantes en la fauna silvestre (Depledge 1994; Fossi & Leonzio 1994; Peakall & Walker 1994). Además, la rapidez con que se producen algunas de estas respuestas (p.ej., las que tienen lugar a nivel bioquímico o molecular) permite utilizarlas como una señal de alerta temprana que puede anticipar efectos a largo plazo sobre la reproducción y la supervivencia (Hagger et al. 2006; Peakall & Walker 1994; Vasseur & Cossu-Leguille 2006). Estos efectos son difíciles de evaluar en ausencia de seguimientos de campo prolongados que resultan muy costosos desde un punto de vista logístico y económico. Sin embargo, el impacto potencial de esos efectos sobre la eficacia biológica de los individuos puede tener consecuencias a nivel poblacional, e incluso a nivel de comunidad o ecosistema: de ahí la importancia del uso de los biomarcadores como señal de alerta temprana (Depledge et al. 1995; Fox 1993).

Otra de las ventajas del empleo de biomarcadores para valorar el impacto de los contaminantes sobre los seres vivos es que muchos de ellos permiten utilizar técnicas de muestreo no destructivas (sangre, huevos, plumas, etc.) (Fossi & Leonzio 1994; Melancon 2003). Este aspecto resulta de especial interés cuando se trabaja con especies catalogadas como raras o amenazadas (Fossi et al. 1999), o en espacios protegidos o de interés desde el punto de vista de la conservación, como es el caso de Doñana. Además de las consideraciones éticas, las técnicas no destructivas permiten obtener muestras del mismo individuo a lo largo del tiempo (medidas repetidas), y por tanto estudiar con precisión el efecto del tóxico a medio-largo plazo utilizando al animal como su propio control.

El uso de biomarcadores plantea, sin embargo, algunos inconvenientes, sobre todo cuando el estudio se lleva a cabo fuera del laboratorio (Fossi 1994; Segner 2007). En condiciones naturales, el individuo se halla expuesto a multitud de factores de estrés o perturbaciones ambientales que pueden modificar su respuesta

frente a la exposición al tóxico. Las condiciones meteorológicas, la disponibilidad de alimento, la presencia de predadores o competidores y varios factores bióticos relacionados con el propio individuo (*host factors*: tamaño, edad, sexo, condición física o estado reproductor, entre otros) pueden influir en la respuesta (Burger et al. 2007; Handy et al. 2003; Segner 2007). A efectos prácticos, estas limitaciones pueden ser evitadas o atenuadas utilizando un diseño experimental adecuado que tenga en cuenta estos y otros factores en el análisis e interpretación de los resultados (Depledge 2009).

La selección de los biomarcadores a estudiar y las pruebas diagnósticas (tests) empleadas dependerá en gran medida de la naturaleza del problema a tratar y de posibles condicionamientos locales (p.ej., limitaciones de tipo logístico, características del hábitat, etc.). La especificidad del test respecto al contaminante objeto de estudio y el grado en el que el posible cambio o respuesta observada pueda estar relacionado con el daño ocasionado, también deberán tenerse en cuenta. En distintas combinaciones, los biomarcadores constituyen la base de lo que se ha dado en llamar *weight-of-evidence approach*, que podría traducirse por “enfoque o aproximación basada en el peso de las pruebas o evidencias” (Depledge 2009; Hagger et al. 2006; Handy et al. 2003). Utilizadas de manera cada vez más rutinaria en la evaluación de riesgos (*Ecological Risk Assessment*, o *ERA* en sus siglas en inglés) (Hagger et al. 2006; Martín-Díaz et al. 2008), la finalidad de este tipo de aproximaciones es demostrar o proporcionar evidencias claras de que los organismos objeto de estudio han estado expuestos a una o varias sustancias tóxicas y/o que esa exposición está relacionada con el deterioro de su salud, pudiendo afectar a su crecimiento, éxito reproductor y supervivencia, parámetros cruciales desde un punto de vista ecológico.

Aunque los objetivos de esta tesis no contemplan llevar a cabo evaluaciones de riesgo toxicológico en sentido estricto, la finalidad de los capítulos que la componen se identifica plenamente con lo expuesto en el párrafo anterior. Para ello, y junto con el análisis de residuos en sangre (estimación de la exposición al vertido), se utilizan una serie de biomarcadores que permiten evaluar el estado de salud general de los organismos expuestos al vertido y los posibles efectos de los metales a corto y medio plazo sobre los individuos. El daño en el ADN, la respuesta inmune, la respuesta adrenocortical al estrés, los niveles de hormonas tiroideas, y varias medidas relacionadas con el metabolismo óseo [niveles plasmáticos de calcio (Ca), fósforo (P) y de la enzima fosfatasa alcalina] constituyen la batería de biomarcadores empleados para tal fin.

Aunque en cada uno de los capítulos de esta tesis se hace una descripción detallada del biomarcador utilizado, a continuación se introducen brevemente cada uno de ellos.

Biomarcadores objeto de estudio

Daño en el ADN

Los biomarcadores a nivel molecular constituyen una de las primeras respuestas del organismo frente a la exposición a contaminantes (Depledge et al. 1995). Entre ellos, el daño en el ADN es uno de los biomarcadores de creciente relevancia en el estudio del estrés ambiental, tanto en el medio acuático como en el terrestre (Anderson et al. 1994; Bonisoli-Alquati et al. 2010; Mitchelmore & Chipman 1998; Shugart 2000). La genotoxicidad de los contaminantes ambientales, entre ellos algunos metales (García-Lestón et al. 2010; Kakkar & Jaffery 2005), incluye efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos que pueden tener consecuencias a medio-largo plazo sobre la eficacia biológica de los individuos (Anderson & Wild 1994; Ellegren et al. 1997), de ahí su importancia para la dinámica de las poblaciones y su interés para la biología de la conservación.

Respuesta inmune

El sistema inmune es una pieza clave en el estudio de los efectos de los contaminantes sobre los organismos vivos y de su posible impacto sobre niveles superiores de organización biológica (Eeva et al. 2005; Letcher et al. 2010; Melancon 2003). Numerosos trabajos publicados en los últimos años destacan el papel de distintos parámetros inmunológicos como biomarcadores o indicadores del estado de salud de los individuos, así como su sensibilidad frente a la exposición a tóxicos en comparación con otras medidas o indicadores de salud (Fairbrother et al. 2004; Galloway & Handy 2003; Grasman 2002). Así, algunos de los efectos adversos de los contaminantes sobre el sistema inmune aparecen a concentraciones mucho más bajas de las necesarias para apreciar signos manifiestos de toxicidad en el organismo (Wong et al. 1992), y pueden persistir tiempo después de que otras respuestas hayan desaparecido. Por ello, las pruebas de función inmune constituyen indicadores sensibles, de alerta temprana y a largo plazo de efectos subletales sobre la salud de los individuos y las poblaciones.

Sistema endocrino

Al igual que en el caso del sistema inmune, la respuesta endocrina frente a la exposición a contaminantes suele ser rápida, sensible a niveles bajos, y anticipar problemas de salud más significativos (Kendall et al. 1998). Aunque la mayor parte de los estudios sobre disrupción o modulación endocrina en fauna silvestre se han centrado en aspectos relacionados con la reproducción (eje endocrino Hipotálamo-

Pituitaria-Gónadas, HPG), los contaminantes ambientales pueden afectar, y de hecho hacerlo más frecuentemente, a otros ejes no relacionados directamente con los esteroides gonadales (ver, p.ej., Baos & Blas 2008 y referencias allí citadas; Guillette 2006). El eje endocrino Hipotálamo-Pituitaria- Glándulas adrenales (HPA) regula e integra muchos de los cambios fisiológicos que se producen en respuesta al estrés ambiental (Wingfield & Kitaysky 2002). La exposición a una perturbación (química o de otra naturaleza) da lugar a la secreción de glucocorticoides desde las glándulas adrenales (principalmente corticosterona en el caso de las aves) que pueden alterar la fisiología del organismo, afectando al metabolismo intermediario, al crecimiento, o a la función inmune (ver revisiones en Kitaysky et al. 2003; Sapolsky et al. 2000).

Otro de los ejes endocrinos que puede verse afectado por la exposición a sustancias tóxicas es el eje Hipotálamo-Pituitaria-Glándula tiroidea (HPT). Las hormonas tiroideas [tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3)] desempeñan un papel muy importante en el metabolismo, con profundos efectos en el desarrollo de los organismos (tanto en la fase de diferenciación como en la de crecimiento) (McNabb 2000). De hecho, las alteraciones tanto de la función adrenal como de la tiroidea pueden tener graves consecuencias para los organismos en desarrollo, como por ejemplo, reducción del crecimiento, merma de las capacidades cognitivas o alteración de la función inmune (Schantz & Widholm 2001; Smits et al. 2002; Vos et al. 2000). A largo plazo, estos efectos pueden impactar negativamente en el éxito reproductor y supervivencia de los organismos, y por tanto, en su eficacia biológica (Blas et al. 2007; McArthur et al. 1983).

Metabolismo óseo

La aparición de pollos de cigüeña blanca con malformaciones óseas en picos y patas durante los años inmediatamente posteriores al accidente minero (a partir de 1999) en un núcleo reproductor localizado a pocos kilómetros de la zona afectada por la riada tóxica (Dehesa de Abajo, Puebla del Río, Sevilla), motivó la puesta en marcha de varios estudios para determinar el origen de estas malformaciones y su posible relación con la exposición a los metales vertidos. Es necesario destacar que el seguimiento estandarizado de los parámetros reproductivos de las cigüeñas en este núcleo reproductor se venía realizando desde que aparecieron los primeros nidos a principios de los años ochenta, y que nunca antes se habían detectado este tipo de malformaciones o anomalías en el crecimiento de los pollos.

Las deformaciones o malformaciones morfológicas han sido descritas con anterioridad en aves expuestas a contaminantes ambientales (Bowerman 1994; Gilbertson et al. 1991; Hoffman et al. 1988). Aunque los mecanismos a través de

los cuales se producen estas malformaciones suelen ser bastante complejos, ciertos parámetros bioquímicos como la enzima fosfatasa alcalina, cuya isoforma ósea está directamente asociada con el crecimiento del hueso, o los niveles relativos (proporción o razón, *ratio*) de dos minerales: Ca y P, desempeñan un papel destacado en el metabolismo óseo (Fowler 1986). Un desequilibrio en los niveles de cualquiera de estos parámetros puede dar lugar a anomalías esqueléticas, especialmente en individuos en desarrollo.

ESPECIES CENTINELAS. LAS AVES COMO BIOINDICADORES AMBIENTALES

La necesidad de identificar especies y poblaciones susceptibles de ser utilizadas como bioindicadores ambientales o “centinelas” surge ante la imposibilidad de llevar a cabo un amplio estudio de biomarcadores sobre todos y cada uno de los componentes de un ecosistema. La función de estas especies/poblaciones es la de alertar de los posibles riesgos que la exposición a los contaminantes podría suponer tanto para la salud humana como para la del resto de seres vivos del ecosistema (Fox 2001; LeBlanc 1995; Sheffield et al. 1998; Stahl 1997) (a pesar de las limitaciones relacionadas con la extrapolación de efectos entre especies, entre localidades, etc., ver Frame & Dickerson 2006). Para que una especie pueda ser considerada como centinela es necesario que cumpla una serie de requisitos relacionados, entre otros, con su sensibilidad al tóxico, distribución geográfica, estatus migratorio, nivel trófico o grado de amenaza (este último relacionado con el tipo de muestreo que requiera el biomarcador objeto de estudio: destructivo o no, invasivo o no, etc.) (Becker 2003). Estos requisitos varían según la naturaleza del problema a tratar y del área de estudio, pero son muchas las especies de aves que los reúnen con facilidad (para más detalles, ver Baos & Blas 2008 y referencias allí citadas) y por ello han sido utilizadas como indicadores de la salud de los ecosistemas o bioindicadores (Furness 1993; Kushlan 1993).

El uso de las aves como especies centinelas no es reciente. Por ejemplo, los canarios (*Serinus canaria*) fueron utilizados durante siglos en las minas de carbón para detectar las fugas de gases procedentes de las excavaciones (Burrell & Seibert 1916; Schwabe 1984). Durante los años sesenta y setenta del pasado siglo, las aves recibieron especial atención como centinelas de los efectos ocasionados por contaminantes persistentes como los compuestos organoclorados (DDTs, PCBs, etc.), tras descubrirse que la exposición a este tipo de sustancias provocaba el adelgazamiento de la cáscara de los huevos (Hickey & Anderson 1968; Ratcliffe



1970), y que este efecto era una de las principales causas de los grandes declives de población que sufrieron rapaces como el águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*) o el halcón peregrino (*Falco peregrinus*) en EEUU, Canadá o Reino Unido, así como varias especies de gaviotas, cormoranes, charranes o pelícanos en la zona de los Grandes Lagos de Norteamérica (p.ej., Fox 1991; Grasman et al. 1998). Desde entonces, una gran variedad de especies de aves han sido utilizadas como centinelas o bioindicadores de contaminación ambiental (p.ej., Mallory et al. 2010; McCarty 2002; Romijn et al. 1995; Verreault et al. 2010). Además, en comparación con otros vertebrados, las aves son organismos conspicuos, relativamente fáciles de observar. Su biología, comportamiento y ecología están bastante bien descritos, lo que potencia su utilidad como bioindicadores reduciendo el riesgo de interpretaciones erróneas. Por todo ello, y por la importancia de la conservación de la avifauna en Doñana (WHC/UNESCO 2014), resulta especialmente interesante el uso de las aves como modelo de estudio en esta tesis. Entre ellas, el milano negro, y sobre todo la cigüeña blanca, destacan por cumplir una serie de requisitos:

- Ambas son especies de larga vida, lo que permite examinar los efectos subletales de los contaminantes a corto, medio y largo plazo.
- Las dos especies se sitúan en los eslabones más altos de las cadenas tróficas de las marismas de Doñana, alimentándose de fauna vertebrada e invertebrada tanto acuática como terrestre.
- Aunque se trata de especies migradoras, los pollos son alimentados con presas procedentes del entorno durante su estancia en el nido, lo que asegura que la exposición a los metales y los posibles efectos relacionados con ella tengan su origen en el vertido y no en otras fuentes de contaminación. Así quedó demostrado en el caso del Pb encontrado en sangre de pollos de cigüeña tras realizar análisis de isótopos (Meharg et al. 2002).
- En ambas especies se ha comprobado la acumulación de importantes cantidades de metales tras el vertido tóxico de Aznalcóllar (Benito et al. 1999; Hernández et al. 1999).
- En el caso de la cigüeña, el núcleo reproductor de la Dehesa de Abajo está situado a pocos kilómetros de la zona directamente afectada por el vertido, y ha sido objeto de un seguimiento científico pormenorizado (ver *Métodos Generales*) desde la formación de este núcleo de cría a comienzos de los años ochenta. Este hecho permite llevar a cabo comparaciones longitudinales tanto a nivel poblacional como a nivel individual, y con ello entender las posibles repercusiones de la contaminación ocasionada por el vertido a medio y largo plazo.

OBJETIVOS Y ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS

El principal objetivo de esta tesis es el de evaluar cómo puede haber afectado el vertido tóxico de la mina de Aznalcóllar a las aves de Doñana y su entorno, tanto a corto, como a medio y largo plazo. Para ello se utilizan como especies centinelas la cigüeña blanca y el milano negro, centrándose en los pollos de ambas especies por representar estos, dentro del ciclo vital de las aves, el estadio más vulnerable a los efectos de los contaminantes (Gochfeld 1997; Peakall & Burger 2003; Scanes & McNabb 2003).

Esta tesis consta de cinco capítulos. En los cuatro primeros se estudia el efecto a corto-medio plazo de la exposición al vertido en pollos de ambas especies utilizando una serie de biomarcadores a nivel molecular, bioquímico y fisiológico. En el quinto y último, se evalúan los posibles efectos a largo plazo sobre la reproducción en pollos de cigüeña expuestos al vertido durante su desarrollo. En detalle:

Capítulo 1: Respuesta inmune celular en pollos de cigüeña blanca y milano negro.

/ Immune response and heavy metals in birds.

Capítulo 2: Daño en el ADN en pollos de cigüeña blanca y milano negro.

/ Genotoxic effects of heavy metals in birds.

Capítulo 3: Respuesta adrenocortical al estrés y niveles de hormonas tiroideas en pollos de cigüeña blanca.

/ Endocrine parameters and heavy metals in storks.

Capítulo 4: Alteraciones en el metabolismo óseo en pollos de cigüeña blanca.

/ Disrupted bone metabolism in contaminant-exposed storks.

Capítulo 5: Efectos de la exposición al vertido durante el desarrollo en la reproducción de la cigüeña blanca.

/ Developmental exposure to pollutants and fitness.

En cada uno de estos capítulos (a excepción de los dos últimos; Capítulos 4 y 5) se explora la relación entre estos biomarcadores y los niveles de cinco metales: Cu, Zn, Pb, Cd y As. Tal y como se ha mencionado con anterioridad, estos elementos fueron seleccionados por ser los más abundantes en el vertido, y los que se detectaron mayoritariamente en las cadenas tróficas de Doñana durante el seguimiento posterior. De ellos, dos son elementos esenciales, Cu y Zn, y tres no esenciales, Pb, Cd y As (metaloide). Se miden en sangre recolectada a lo largo de

varios años de muestreo (Capítulos 1 y 2), lo que, por otro lado, permite determinar la evolución en el tiempo de los niveles de metales (exposición).

Por último, en el Capítulo 5, se estudian los efectos de la exposición al vertido de Aznalcóllar durante el desarrollo ontogénico de pollos de cigüeña blanca sobre los parámetros reproductivos de estos individuos a lo largo de varios años (1999-2005). El marcaje de los individuos muestreados en nido permitió un seguimiento detallado a largo plazo. Así, el estudio continuado del éxito reproductor después del accidente minero, unido al hecho de que se estuviera realizando un seguimiento de esta población antes de la catástrofe, ofreció la oportunidad de evaluar a largo plazo, y en condiciones naturales, los efectos de la exposición al vertido durante el período de desarrollo sobre la reproducción de los individuos afectados.

Con todo ello, y puesto que los vertidos tóxicos son, desafortunadamente, una constante en la sociedad industrial y tecnológica en la que vivimos, se tratará, desde una perspectiva de conservación, de obtener directrices para abordar de forma eficaz una correcta “gestión científica” de estos desastres y contar así con mejores herramientas con las que enfrentarse en el futuro a potenciales catástrofes de esta índole.

Durante los últimos años existe una marcada tendencia a maquetar las tesis doctorales a modo de compilación de varios artículos científicos que ya han sido publicados o que están en proceso de publicación. Al optarse por una presentación de tesis que siguiera este formato, resulta inevitable que en algunos capítulos aparezca información redundante, especialmente la referida a la descripción del vertido y a los materiales y métodos (p.ej., muestreos de campo, análisis de metales, análisis estadísticos, etc.). No obstante, todos y cada uno de los capítulos aquí presentados muestran resultados originales y específicos, y poseen una entidad propia e independiente de acuerdo con los objetivos que se han detallado en esta introducción.

REFERENCIAS

- Anderson SL, Wild GC. 1994. Linking Genotoxic Responses and Reproductive Success in Ecotoxicology. *Environ Health Perspect* 102: 9-12.
- Anderson SL et al. 1994. Genetic and Molecular Ecotoxicology: A Research Framework. *Environ Health Perspect* 102: 3-8.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profiles. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2004. Interaction Profiles for Toxic Substances. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ip04.html>
- Banks JE, Starks JD. 1998. What is Ecotoxicology? An Ad-hoc Grab Bag or an Interdisciplinary Science? *Integr Biol* 1(5): 195-204.
- Baos R, Blas J. 2008. Adrenal Toxicology in Birds: Environmental Contaminants and the Avian Response to Stress. En: *Adrenal Toxicology*. Harvey PW, Everett DJ, Springall CJ (Eds). *Target Organ Toxicology Series*, Vol. 26. Hayes AW, Thomas JA, Gardner DE (Ser Eds). Informa Helthcare, NY (USA), pp. 257-294.
- Becker PH. 2003. Biomonitoring with Birds. En: *Bioindicators and Biomonitoring*. Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (Eds), Elsevier, Oxford, UK, pp. 677-736.
- Benito V et al. 1999. Trace Elements in Blood Collected from Birds Feeding in the Area around Doñana National Park Affected by the Toxic Spill from the Aznalcóllar Mine. *Sci Tot Environ* 242: 309-323.
- Berglund M et al. 2000. Metal-Bone Interactions. *Toxicol Lett* 112-113: 219-225.
- Blas J et al. 2007. Stress Response During Development Predicts Fitness in a Wild, Long Lived Vertebrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(21): 8880-8884.
- Blasco J, Del Valls TA. 2005. *Integrated Assessment and Management of the Ecosystems Affected by the Aznalcóllar Mining Spill (SW, Spain)*. Cátedra UNESCO (Unitwin: Wicop), 385 pp.
- Bonisoli-Alquati A et al. 2010. DNA Damage in Barn Swallows (*Hirundo rustica*) from the Chernobyl Region Detected by Use of the Comet Assay. *Comp Biochem Physiol (Part C)* 151(3): 271-277.
- Bowerman WW. 1994. Observed Abnormalities in Mandibles of Nestling Bald Eagles *Haliaeetus leucocephalus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 53: 450-457.
- Burger J et al. 2007. Methodologies, Bioindicators, and Biomarkers for Assessing Gender-related Differences in Wildlife Exposed to Environmental Chemicals. *Environ Res* 104(1): 135-152.
- Burger J et al. 2003. Methodologies to Examine the Importance of Host Factors in Bioavailability of Metals. *Ecotox Environ Saf* 56: 20-31.
- Burrell GA, Seibert FM. 1916. Gases Found in Coal Mines. Miners' Circular 14. Bureau of Mines. Department of the Interior, Washington, DC.
- Bustnes JO et al. 2007. Reproductive Performance and Organochlorine Pollutants in an Antarctic Marine Top Predator: The South Polar Skua. *Environ Int* 33(7): 911-918.
- Bustnes JO et al. 2003. Ecological Effects of Organochlorine Pollutants in the Arctic: A Study of the Glaucous Gull. *Ecol Appl* 13(2): 504-515.
- Clements WH. 2000. Integrating Effects of Contaminants Across Levels of Biological Organization: An Overview. *J Aquat Ecosyst Stress Recov* 7: 113-116.

- Colborn T, Clement C. 1992. *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection*. Princeton Scientific Pub.
- Depledge MH. 2009. Novel Approaches and Technologies in Pollution Assessment and Monitoring: A UK Perspective. *Ocean Coast Manage* 52(7): 336-341.
- Depledge MH. 1994. The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological Tools. En: *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Fossi MC and Leonzio C (Eds.) Lewis Publishers, Boca Raton (FL), USA, pp. 271-295.
- Depledge MH et al. 1995. Assessment of Trace Metal Toxicity Using Molecular, Physiological, and Behavioral Biomarkers. *Mar Poll Bull* 31(1-3): 19-27.
- Dickerson SM, Gore AC. 2007. Estrogenic Environmental Endocrine-disrupting Chemical Effects on Reproductive Neuroendocrine Function and Dysfunction Across the Life Cycle. *Rev Endocr Metab Disord* 8: 143-159.
- Di Giulio RT, Tillit DE. 1999. *Reproductive and Developmental Effects of Contaminants in Oviparous Vertebrates*. SETAC Pub, Pensacola (FL), USA, 447 pp.
- Eeva T et al. 2005. Pollution Related Effects on Immune Function and Stress in a Free-living Population of Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *J Avian Biol* 36: 405-412.
- Ellegren H et al. 1997. Fitness Loss and Germline Mutations in Barn Swallows Breeding in Chernobyl. *Nature* 389(9): 593-596.
- EPA's (Environmental Protection Agency, USA) Integrated Risk Information System (IRIS). Toxicology Reviews. Disponible en: <http://www.epa.gov/iris/>
- Evers DC et al. 2008. Adverse Effects from Environmental Mercury Loads on Breeding Common Loons. *Ecotoxicology* 17: 69-81.
- Fairbrother A et al. 2007. Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotox Environ Saf* 68(2): 145-227.
- Fairbrother A et al. 2004. Avian Immunotoxicology. *J Toxicol Environ Health (Part B)* 7: 105-137.
- Fernie KJ et al. 2003. Developmental Toxicity of in Ovo Exposure to Polychlorinated Biphenyls: I. Immediate and Subsequent Effects on First-generation Nestling American kestrels (*Falco sparverius*). *Environ Toxicol Chem* 22(3): 554-560.
- Fernie KJ et al. 2001. In Ovo Exposure to Polychlorinated Biphenyls: Reproductive Effects on Second-generation American kestrels. *Arch Environ Contam Toxicol* 40: 544-550.
- Florea AM, Buessenberg D. 2006. Occurrence, Use and Potential Toxic Effects of Metals and Metal Compounds. *Biometals* 19(4): 419-427.
- Forbes V et al. 2006. The Use and Misuse of Biomarkers in Ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem* 25(1): 272-280.
- Fossi MC. 1994. Nondestructive Biomarkers in Ecotoxicology. *Environ Health Perspect*, 102(Suppl 12): 49-54.
- Fossi MC, Leonzio C. 1994. *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers. Boca Raton (FL), USA.
- Fossi MC et al. 1999. Nondestructive Biomarkers of Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals in Endangered Species of Wildlife. *Chemosphere* 39(8): 1273-1285.
- Fowler ME. 1986. Metabolic Bone Disease. En: *Zoo and Wild Animal Medicine*. Fowler ME (Ed). WB Saunders Co, Philadelphia (PA), USA, pp. 69-90.
- Fox GA. 2001. Wildlife as Sentinels of Human Health Effects in the Great Lakes-St. Lawrence Basin. *Environ Health Perspect* 109(Suppl.6): 853-861.

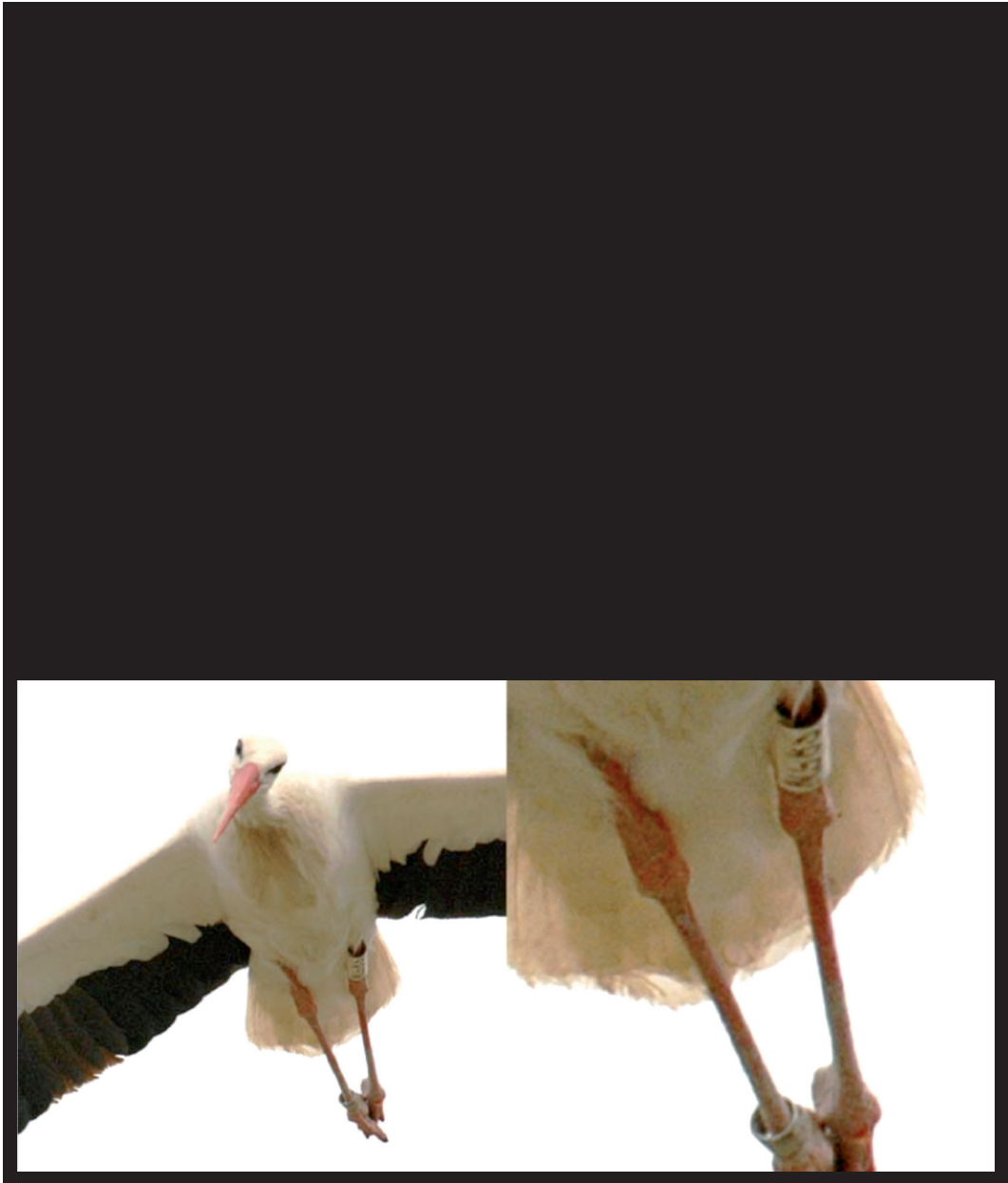
- Fox GA. 1993. What Have Biomarkers Told Us About the Effects of Contaminants on the Health of Fish-eating Birds in the Great Lakes? The Theory and a Literature Review. *J Great Lakes Res* 19(4): 722-736.
- Fox GA. 1991. Reproductive Outcomes in Colonial Fish-eating Birds: A Biomarker for Developmental Toxicants in Great Lakes Food Chains. *J Great Lakes Res* 17(2): 153-157.
- Frame L, Dickerson RL. 2006. Fish and Wildlife as Sentinels of Environmental Contamination. En: *Endocrine Disruption: Biological Bases for Health Effects in Wildlife and Humans*. Norris DO, Carr JA (Eds), Oxford University Press, NY, USA, pp. 202-222.
- Fry DM. 1995. Reproductive Effects in Birds Exposed to Pesticides and Industrial Chemicals. *Environ Health Perspect* 103(Suppl.7): 165-171.
- Furness RW. 1993. Birds as Monitors of Pollutants. En: *Birds as Monitors of Environmental Change*. Furness RW, Greenwood JJD (Eds), Chapman and Hall, London, UK, pp. 87-143.
- Galloway T, Handy R. 2003. Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides. *Ecotoxicology* 12: 345-363.
- García-Lestón J et al. 2010. Genotoxic Effects of Lead: An Updated Review. *Environ Int* 36(6): 623-636.
- Gilbertson M et al. 1991. Great Lakes Embryo Mortality, Edema, and Deformities Syndrome (GLEMEDS) in Colonial Fish-eating Birds: Similarity to Chick-edema Disease. *J Toxicol Environ Health* 33: 455-520.
- Gochfeld M. 1997. Factors Influencing Susceptibility to Metals. *Environ Health Perspect* 105 (Suppl.4): 817-822.
- Goyer RA. 1997. Toxic and Essential Metal Interactions. *Annu Rev Nutr* 17: 37-50.
- Grasman KA. 2002. Assessing Immunological Function in Toxicological Studies of Avian Wildlife. *Integr Comp Biol* 42: 34-42.
- Grasman KA et al. 1998. Reproductive and Physiological Effects of Environmental Contaminants in Fish-eating Birds of the Great Lakes: A Review of Historical Trends. *Environ Monitor Assess* 53: 117-145.
- Grimalt JO, Macpherson E (Eds). 1999. The Environmental Impact of the Mine Tailing Accident in Aznalcóllar (South-west Spain). *Sci Tot Environ* 242 (1-3)(Special Issue): 336 pp.
- Grimalt JO et al. 1999. The Mine Tailing Accident in Aznalcóllar. *Sci Tot Environ* 242: 3-11.
- Guillette LJ Jr. 2006. Endocrine Disrupting Contaminants - Beyond the Dogma. *Environ Health Perspect* 104(Suppl.1): 9-12.
- Guillette LJ Jr, Gunderson MP. 2001. Alterations in Development of Reproductive and Endocrine Systems of Wildlife Populations Exposed to Endocrine-Disrupting Contaminants. *Reproduction* 122(6): 857-864.
- Guterman L. 2009. Exxon Valdez Turns 20. *Science* 323: 1558-1559.
- Hagger JA et al. 2006. Biomarkers and Integrated Environmental Risk Assessment: Are There More Questions Than Answers? *Integr Environ Assess Manage* 2(4): 312-329.
- Handy RD et al. 2003. A Proposal for the Use of Biomarkers for the Assessment of Chronic Pollution and in Regulatory Toxicology. *Ecotoxicology* 12: 331-343.
- Helberg M et al. 2005. Relationships between Reproductive Performance and Organochlorine Contaminants in Great Black-backed Gulls (*Larus marinus*). *Environ Poll* 134(3): 475-483.
- Hernández LM et al. 1999. Accumulation of Heavy Metals and As in Wetland Birds in the Area around Doñana National Park Affected by the Aznalcóllar Toxic Spill. *Sci Tot Environ* 242: 293-308.

- Hickey JJ, Anderson DW. 1968. Chlorinated Hydrocarbons and Eggshell Changes in Raptorial and Fish-eating Birds. *Science* 162: 271-273.
- Hoffman DJ et al. 1988. Selenium Teratogenesis in Natural Populations of Aquatic Birds in Central California. *Arch Environ Contam Toxicol* 17: 519-525.
- Hose JE, Guillette LJ. 1995. Defining the Role of Pollutants in the Disruption of Reproduction in Wildlife. *Environ Health Perspect* 103: 87-91.
- Iwaniuk AN et al. 2006. The Effects of Environmental Exposure to DDT on the Brain of a Songbird: Changes in Structures Associated with Mating and Song. *Behav Brain Res* 173: 1-10.
- Kakkar P, Jaffery FN. 2005. Biological Markers for Metal Toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 19(2): 335-349.
- Kendall RJ et al. 1998. *Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruptors in Wildlife*. SETAC Press, Pensacola (FL), USA.
- Kitaysky AS et al. 2003. Benefits and Costs of Increased Levels of Corticosterone in Seabird Chicks. *Horm Behav* 43: 140-149.
- Kushlan JA. 1993. Colonial Waterbirds as Bioindicators of Environmental Change. *Colon Waterbirds* 16: 223-251.
- LeBlanc GA. 1995. Are Environmental Sentinels Signaling? *Environ Health Perspect* 103: 888-890.
- Letcher RJ et al. 2010. Exposure and Effects Assessment of Persistent Organohalogen Contaminants in Arctic Wildlife and Fish. *Sci Tot Environ* 408(15): 2995-3043.
- Mallory ML et al. 2010. Seabirds as Indicators of Aquatic Ecosystem Conditions: A Case for Gathering Multiple Proxies of Seabird Health. *Mar Poll Bull* 60: 7-12.
- Martín-Díaz M et al. 2008. Integrative Sediment Quality Assessment Using a Biomarker Approach: Review of 3 Years of Field Research. *Cell Biol Toxicol* 24(6): 513-526.
- McArthur MLB et al. 1983. Ecological Significance of Behavioral and Hormonal Abnormalities in Breeding Ring Doves Fed an Organochlorine Chemical Mixture. *Arch Environ Contam Toxicol* 12: 343-353.
- McCarthy JF, Shugart LR. 1990. *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton (FL), USA.
- McCarty JP. 2002. Use of Tree Swallows in Studies of Environmental Stress. *Rev Toxicol* 4: 61-104.
- McNabb FMA. 2000. Thyroids. En: *Sturkie's Avian Physiology*. Whittow GC (Ed). Academic Press, NY (USA), pp. 461-471.
- Meharg AA et al. 2002. Isotopic Identification of Sources of Lead Contamination for White Stork (*Ciconia ciconia*) in a Marshland Ecosystem (Doñana, S.W. Spain). *Sci Tot Environ* 300: 81-86.
- Melancon MJ. 2003. Bioindicators of Contaminant Exposure and Effect in Aquatic and Terrestrial Monitoring. En: *Handbook of Ecotoxicology*. Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr, Cairns J Jr (Eds), CRC Press, Boca Raton (FL), USA, pp. 257-278.
- Mitchelmore CL, Chipman JK. 1998. DNA Strand Breakage in Aquatic Organisms and the Potential Value of the Comet Assay in Environmental Monitoring. *Mut Res* 399(2): 135-147.
- Pain DJ et al. 1998. The Doñana Ecological Disaster: Contamination of a World Heritage Estuarine Marsh Ecosystem with Acidified Pyrite Mine Waste. *Sci Tot Environ* 222: 45-54.
- Pattee OH, Pain, DJ. 2003. Lead in the Environment. En: *Handbook of Ecotoxicology*. 2nd Ed. Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr, Cairns J Jr (Eds). CRC Press, Boca Raton (FL), USA: 373-408.

- Peakall DB. 1994. The Role of Biomarkers in Environmental Assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3: 157-160.
- Peakall DB, Burger J. 2003. Methodologies for Assessing Exposure to Metals: Speciation, Bio-availability of Metals, and Ecological Host Factors. *Ecotox Environ Saf* 56: 110-121.
- Peakall DB, Walker CH. 1994. The Role of Biomarkers in Environmental Assessment (3). Vertebrates. *Ecotoxicology* 3: 173-179.
- Peterson CH et al. 2003. Long-term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science* 302: 2082-2086.
- Quinn MJ Jr et al. 2008. Consequences of In Ovo Exposure to *p,p'*-DDE on Reproductive Development and Function in Japanese Quail. *Horm Behav* 53(1): 249-253.
- Ratcliffe DA. 1970. Changes Attributed to Pesticides in Egg Breakage Frequency and Eggshell Thickness in Some British Birds. *J Appl Ecol* 7: 67-115.
- Rojas E et al. 1999. Are Metals Dietary Carcinogens? *Mut Res* 443: 157-181.
- Romijn CA et al. 1995. The Use of Japanese and Bobwhite Quail as Indicator Species in Avian Toxicity Test. *Chemosphere* 30: 1033-1040.
- Sapolsky RM et al. 2000. How Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocr Rev* 21: 55-89.
- Scanes CG, McNabb FMA. 2003. Avian Models for Research in Toxicology and Endocrine Disruption. *Avian Poult Biol Rev* 14(1): 21-52.
- Schantz SL, Widholm JJ. 2001. Cognitive Effects of Endocrine Disrupting Chemicals in Animals. *Environ Health Perspect* 109: 1197-1206.
- Scheuhammer AM. 1987. The Chronic Toxicity of Aluminium, Cadmium, Mercury, and Lead in Birds: A Review. *Environ Poll* 46: 263-295.
- Schwabe CW. 1984. Animal Monitors of the Environment. En: *Veterinary Medicine and Human Health*, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 562-578.
- Segner H. 2007. Ecotoxicology - How to Assess the Impact of Toxicants in a Multi-factorial Environment? En: *Multiple Stressors: A Challenge for the Future*. NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. Mothersill C, Mosse I, Seymour C (Eds), Springer, pp. 39-56.
- Sheffield SR et al. 1998. Fish and Wildlife Species as Sentinels for Environmental Endocrine Disrupters. En: *Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife*. Kendall RJ, Dickerson RL, Giesy J, Suk W (Eds), SETAC Press, Pensacola (FL), USA, pp. 369-430.
- Shugart LR. 2000. DNA Damage as Biomarker of Exposure. *Ecotoxicology* 9: 329-340.
- Smits JEG et al. 2005. Skeletal Pathology in White Storks (*Ciconia ciconia*) Associated with Heavy Metal Contamination in Southwestern Spain. *Toxicol Pathol* 33(4): 441-448.
- Smits JE et al. 2002. Thyroid Hormone Suppression and Cell-mediated Immunomodulation in American Kestrels (*Falco sparverius*) Exposed to PCBs. *Arch Environ Contam Toxicol* 43: 338-344.
- Spahn SA, Sherry TW. 1999. Cadmium and Lead Exposure Associated with Reduced Growth Rates, Poorer Fledging Success of Little Blue Heron Chicks (*Egretta caerulea*) in South Louisiana Wetlands. *Arch Environ Contam Toxicol* 37: 377-384.
- Stahl RG Jr. 1997. Can Mammalian and Non-mammalian "Sentinel Species" Data Be Used to Evaluate the Human Health Application of Environmental Contaminants? *Human Ecol Risk Assess* 3: 329-335.

- Taggart MA et al. 2006. After the Aznalcollar Mine Spill: Arsenic, Zinc, Selenium, Lead and Copper Levels in the Livers and Bones of Five Waterfowl Species. *Environ Res* 100(3): 349-361.
- Vasseur P, Cossu-Leguille C. 2006. Linking Molecular Interactions to Consequent Effects of Persistent Organic Pollutants (POPs) upon Populations. *Chemosphere* 62(7): 1033-1042.
- Verreault J et al. 2010. The Svalbard Glaucous Gull as Bioindicator Species in the European Arctic: Insights from 35 Years of Contamination Research. *Rev Environ Contam Toxicol* 205: 77-116.
- Vos JG et al. 2000. Health Effects of Endocrine-disrupting Chemicals on Wildlife, with Special Reference to the European Situation. *Crit Rev Toxicol* 30: 71-133.
- Walker CH et al. 2001. *Principles of Ecotoxicology*. 2nd Ed. Bell and Bain Ltd, Glasgow, UK, 309 pp.
- WHC/UNESCO (UN, World Heritage Convention) 2014. Disponible en: http://whc.unesco.org/pg.cfm?cid=31andid_site=685
- WHO/IPCS (World Health Organization's/ International Programme for Chemical Safety). Environmental Health Criteria. Disponible en: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/index.html>
- Wingfield JC, Kitaysky AS. 2002. Endocrine Responses to Unpredictable Environmental Stress: Stress or Anti-stress Hormones? *Integr Comp Biol* 42: 600-609.
- Wong S et al. 1992. Environmental Immunotoxicology. En: *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Peakall D (Ed). Chapman and Hall, pp. 167-189.

MÉTODOS GENERALES



La metodología empleada en cada estudio se detalla en el capítulo correspondiente, por lo que en este apartado únicamente se hace referencia al área, especies y poblaciones de estudio, así como al trabajo de campo a grandes rasgos. Finalmente se han añadido una serie de consideraciones metodológicas particulares de esta tesis con el objetivo de explicar ciertos aspectos relacionados con su diseño y con algunas de las aproximaciones utilizadas.

ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Ámbito de Doñana, espacio que se localiza en el Suroeste de España (coordenadas: 36° 48'-37° 20' Norte; 6° 12'-6° 40' Oeste), en la desembocadura del río Guadalquivir. Geográficamente la zona ocupa parte de las provincias de Huelva, Sevilla y, en menor medida, Cádiz (en la margen izquierda del río), y limita al sur con el océano Atlántico (Figura 1).

La singularidad ecológica de este entorno ha propiciado que gran parte de la superficie natural se haya preservado bajo distintas figuras de protección como Reserva Biológica, Parque Nacional y Parque Natural. La mayor parte del trabajo de campo de esta tesis se ha realizado dentro de estos espacios protegidos o en sus zonas de influencia (Pre-parque).

Conservación

El área de Doñana ha sido históricamente reconocida como uno de los principales refugios de fauna y flora de la Península Ibérica, en el que la escasez de intervenciones humanas ha permitido conservar la heterogeneidad de sus ecosistemas. Durante siglos fue apreciada por su valor cinegético, lo que motivó que en el año 1262, el rey Alfonso X el Sabio designara algunos terrenos como “Cazadero Real de la Corona”. Dos siglos más tarde, Fernando el Católico crea el “Coto Real”, también conocido como “Bosque Real”. Entre los siglos XVI y XX, el terreno fue propiedad de varios aristócratas españoles que lo utilizaron para su uso y disfrute.

A mediados del siglo XX, al mismo tiempo que la zona sufre varias amenazas de transformación, se despierta el interés por la biodiversidad que alberga y la necesidad de preservarla. Se publican entonces varios estudios sobre la importancia de la zona para la fauna (Valverde 1958, 1960, 1967), y tras varias expediciones de científicos españoles y extranjeros se consigue, con el apoyo internacional, que en 1963 el Estado Español, en colaboración con el Fondo Mundial para la



Figura 1. Localización del Parque Nacional de Doñana y áreas protegidas circundantes.

Conservación de la Naturaleza (WWF), adquiriera unas 7000 ha para garantizar su conservación. Se crea así la primera área protegida, la Reserva Biológica de Doñana (1964) (Figura 1).

Algunos años después, en 1969, se declara el Parque Nacional de Doñana con una extensión de 37 425 ha. De esta forma se reconoce explícitamente el alto valor natural y cultural de la zona y se establecen medidas de gestión que garanticen su conservación. Sus límites se amplían en varias ocasiones. La primera en 1978 (“Ley de Doñana”), y la más reciente en 2004, creciendo hasta llegar a la superficie actual de 54 252 ha, a las que hay que sumar más de 73 000 ha bajo distintas figuras de protección (ver párrafos siguientes).

El territorio actual incluye un mosaico de ecosistemas que albergan una biodiversidad única en Europa, destacando sobre todo la marisma, de extraordinaria importancia como lugar de paso, cría e invernada para miles de aves europeas y africanas, así como otros ecosistemas también excepcionales y singulares como “La Vera”, el sistema dunar, y el conjunto de lagunas que bordean el Parque (ver apartado siguiente). Todo ello ha hecho a Doñana merecedora de una serie de reconocimientos a nivel nacional e internacional. En 1980, es declarada Reserva de la Biosfera por la UNESCO. Dos años más tarde, el Parque Nacional es designado como Sitio RAMSAR. En 1985, el Consejo de Europa le otorga el Diploma Europeo a la Gestión, renovado en 1990, 1995 y 2000. En 1988 se declara zona ZEPA (Zona de Especial Protección para las Aves), de acuerdo con la Directiva 79/409/CEE, de 2 de abril de 1979, relativa a la Conservación de las Aves Silvestres en Europa. Con ésta, el Estado Español contrae la obligación de evitar el deterioro y la contaminación del hábitat así como de aquellas perturbaciones que pudieran afectar a las aves. En 1990 se incluye en el registro de Montreaux de lugares que presentan riesgos para su conservación. Finalmente, en 1994, es inscrita en la lista de los sitios Patrimonio de la Humanidad de la UNESCO (García Novo & Marín Cabrera 2006).

El Parque Nacional de Doñana ha de contemplarse como el núcleo de una red de espacios que en conjunto ocupan más de 121 000 ha, entre los que destaca el Parque Natural de Doñana, que rodea al Parque Nacional (Figura 1). La propia declaración de Doñana como Reserva de la Biosfera por la UNESCO definía como zona núcleo al Parque Nacional y como zona tampón un área superior a las 26 000 ha en terrenos que hoy constituyen el Parque Natural de Doñana, quedando sin definir una zona de transición. En la Figura 1 se representa el conjunto de espacios naturales declarados en el entorno de Doñana. Algunos de estos espacios han sido también designados como zona ZEPA, Sitio RAMSAR o Lugar de Interés Comunitario.

Otros espacios del entorno se encuentran bajo las categorías de Parajes, Reservas o Paisajes Naturales. Entre ellos, la Reserva Natural Concertada de la Dehesa de Abajo, donde se halla el núcleo reproductor de cigüeñas blancas

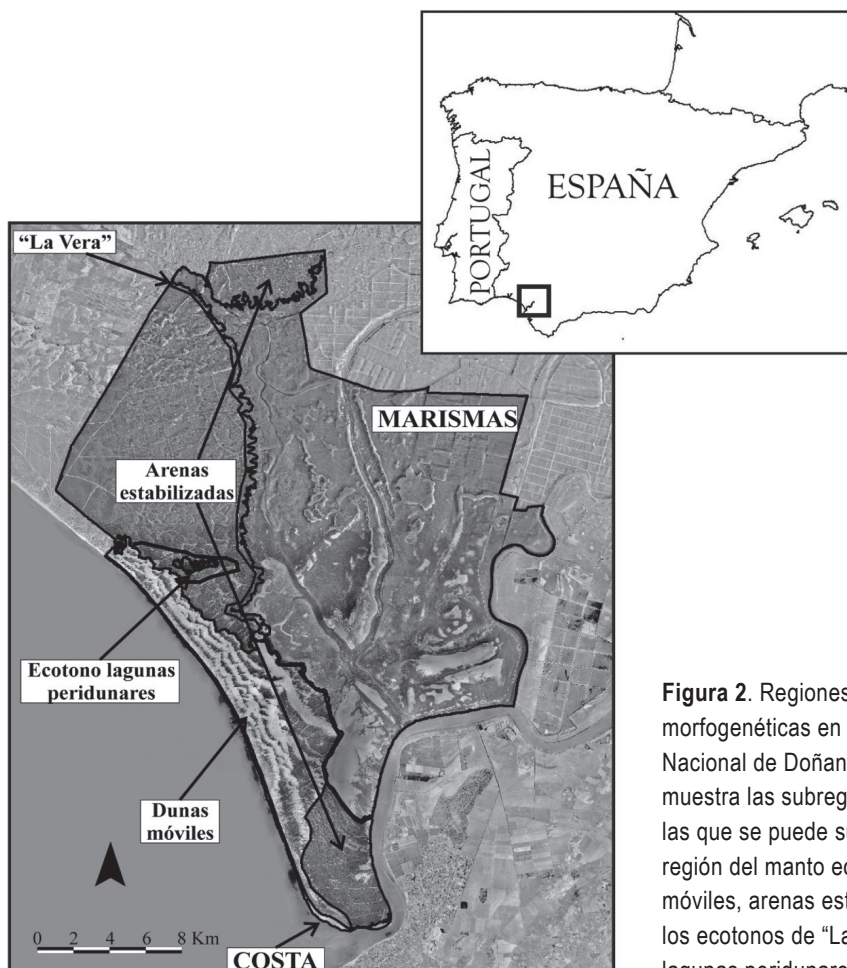


Figura 2. Regiones morfogenéticas en el Parque Nacional de Doñana. La figura muestra las subregiones en las que se puede subdividir la región del manto eólico: dunas móviles, arenas estabilizadas, y los ecotonos de "La Vera" y las lagunas peridunares.

(*Ciconia ciconia*) objeto de estudio de esta tesis. La finca de la Dehesa de Abajo se localiza en el municipio de la Puebla del Río (Sevilla, coordenadas: 37° 13' Norte; 6° 09' Oeste). Posee una gran riqueza ecológica y permite comunicar la marisma con el monte. Se encharca en ciertas épocas del año y acoge gran cantidad de especies migratorias.

El último de los espacios declarados, situado más al norte del Parque Nacional, ha sido el Paisaje Protegido Corredor Verde del Guadiamar. Su declaración estuvo motivada por el accidente minero que provocó el vertido de lodos piríticos de la mina de Aznalcóllar, origen también de esta tesis. La recuperación de este espacio, tras la limpieza y retirada de los lodos, dio lugar a uno de los proyectos más ambiciosos realizados en el entorno de Doñana: generar un corredor verde de conectividad ecológica con los espacios protegidos de la Sierra y recuperar la funcionalidad y calidad ambiental histórica del cauce del río Guadiamar.

Descripción física

El origen de este territorio se encuentra en el relleno en diferentes capas del antiguo estuario del río Guadalquivir tras ser cerrado parcialmente por una flecha litoral arenosa (Rodríguez-Ramírez & Clemente 2002). En él se diferencian tres sistemas o regiones morfogenéticas: litoral (costa), eólico (dunas), y estuario (marisma) (Figura 2), que se reseñan brevemente a continuación. Para una descripción más extensa desde un punto de vista ecológico y geomorfológico consultar Allier et al. 1974; Amat et al. 1979; Castroviejo 1993; García Novo et al. 1978; Montes et al. 1998; Ramos 2002; Rodríguez-Ramírez & Clemente 2002; Siljeström et al. 1994; Valverde 1958, 1967).

La **costa** se sitúa al suroeste del Parque Nacional, constituyendo el límite con el océano Atlántico. Ocupa una franja de 28 km de longitud y está formada por sustrato arenoso. Su orografía es suave.

La **marisma** se localiza al este del Parque, junto al curso del río Guadalquivir, y es el más extenso de todos los ecosistemas, ocupando en torno al 50% de su superficie. Está constituida por los sedimentos depositados en el antiguo estuario del Guadalquivir durante los últimos siglos, en los que ha ido evolucionando desde una marisma mareal típica a un delta interno recorrido por canales inestables (Clemente et al. 1998). Litológicamente está formada por limos y arcillas. De carácter estacional, su régimen de inundación está fuertemente marcado por las precipitaciones. Durante el invierno, el agua inunda la marisma mediante el aporte directo de las precipitaciones y la contribución superficial de los arroyos de la Rocina y el Partido y el río Guadiamar. En ella germinan plantas como la castañuela (*Scirpus maritimus*)



o el bayunco (*Scirpus lacustris*), cubriéndola prácticamente en su totalidad durante muchos meses. En esta época la marisma ofrece alimento y protección a más de 150 especies de aves (García et al. 2000). En contraposición, la lámina de agua disminuye durante la primavera y desaparece durante los meses de verano, cuando el balance hídrico se vuelve negativo. Las pequeñas diferencias de altitud permiten distinguir tres ecosistemas en el entorno inundable: i) caños (cursos de agua principales), ii) lucios (zonas permanentemente inundadas) y iii) vetas (zonas que se mantienen permanentemente por encima del nivel del agua). Durante la primavera y el verano, las vetas sirven como lugar de nidificación a más de 125 especies de aves (principalmente fochas, anátidas, ardeidas y larolimícolas; García et al. 2000; Valverde 1960) que convierten a la marisma en una de las principales fuentes de alimento para las aves depredadoras como el milano negro (*Milvus migrans*).

El **manto eólico** está formado por las dunas móviles, las arenas estabilizadas y las zonas de contacto (ecotonos). Ocupa una gran superficie del territorio, situándose en la parte más occidental del Parque (Figura 2).

Las *dunas móviles* se originan a pie de playa, donde el empuje de los vientos atlánticos propicia su avance hacia el interior. Este sistema ocupa una franja estrecha (3-5 km de ancho, 25 km de largo) y se constituye en tres o cuatro frentes paralelos a la línea de costa. Entre estos frentes se forman los valles interdunares, también llamados corrales, en los que suelen aparecer masas arbóreas en las que predomina el pino piñonero (*Pinus pinea*). Los corrales constituyen un obstáculo al avance de las dunas, aunque terminan siendo enterrados por ellas. Enebro, sabinas (*Juniperus spp.*) y bayuncos (*Psamma arenaria*) también pueden aparecer en la comunidad vegetal representativa de este ecosistema, que es escasa y adaptada a condiciones extremas.

Las *arenas estabilizadas* (cotos), muestran un característico relieve ondulado que pone de manifiesto su origen dunar, y están dominados por matorral y bosque mediterráneo de carácter xerófilo. Una de las principales características de los cotos reside en el hecho de que las variaciones en la profundidad de la capa freática, fuertemente ligadas a la topografía, condicionan notablemente la composición de la comunidad vegetal. En general, se pueden distinguir dos grandes tipos de asociaciones arbustivas: el monte blanco, donde predominan jaguarzos (*Halimium spp.*), tomillos (*Thymus vulgaris*), lavandas (*Lavandula stoechas*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) en las zonas más secas; y el monte negro, con brezales densos en los que domina *Calluna vulgaris* y *Erica scoparia*, y se localiza en los lugares en los que la capa freática es más superficial (más húmedos). Esta última formación vegetal rodea también las numerosas charcas o lagunas temporales que se forman tras la caída de las fuertes precipitaciones otoño-invernales y donde la vegetación de porte arbóreo está representada por madroños (*Arbutus unedo*), mirtos (*Myrtus*



communis) y alcornoques (*Quercus suber*) dispersos, únicos vestigios del bosque que antiguamente se extendía sobre estas arenas y que en algunos lugares ha sido sustituido por los actuales pinares de *Pinus pinea*. Otras especies arbóreas como enebros y sabinas (*Juniperus spp.*) cerca de la costa, y acebuches (*Olea spp.*), se distribuyen de forma dispersa o formando bosques de extensión variable.

Dentro de los cotos, el bosque mediterráneo de alcornoques posee, en determinadas fincas al norte del Parque Nacional (p.ej., Matasgordas), un denso sotobosque de lentiscos (*Pistacea lentiscus*) y jaras (*Cistus spp.*, *Halimium spp.*), que constituye uno de los hábitats de nidificación preferidos por el milano negro y donde se han registrado las mayores densidades de nidificación (Forero et al. 2002). También los pinos y los eucaliptos (*Eucaliptus spp.*) son utilizados como soporte de nidificación preferidos por los milanos negros y por otras rapaces (p.ej., milanos reales *Milvus milvus*, águilas calzadas *Hieraaetus pennatus*, águilas culebreras *Circaetus gallicus*), que junto con los carnívoros (p.ej., tejón *Meles meles*, meloncillo *Herpestes pardinus*, zorro *Vulpes vulpes*, etc.) representan la variada y abundante comunidad de vertebrados predadores (Valverde 1967). La presencia del linco ibérico (*Lynx pardinus*) y el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) evidencia la riqueza de esta comunidad. En la base de las redes tróficas, el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) y la perdiz roja (*Alectoris rufa*) son algunos de los vertebrados terrestres más frecuentes en este ecosistema, que además cuenta con la presencia de ungulados como ciervos (*Cervus elaphus*) y jabalíes (*Sus scrofa*). Fuera de los límites del área protegida, los cotos han sido transformados en tierras de cultivo y plantaciones de pino piñonero, aunque también existen parches de vegetación natural que se concentran a lo largo de los arroyos. Estas zonas también son utilizadas por la población de milanos negros, que nidifica en los pinares, forma dormideros en enclaves localizados y busca alimento en gran parte de estas fincas.

Las *zonas de contacto*: se distinguen dos ecotonos o zonas de transición dentro de las arenas estabilizadas. Uno es el que se produce en el contacto de las arenas estabilizadas con las dunas móviles, formando el llamado cordón de lagunas peridunares y el otro en el límite de inundación de la marisma, dando lugar a “La Vera” (Figura 2).

El *cordón de lagunas peridunares* se forma debido a la descarga de los acuíferos colgados en los frentes dunares (Clemente et al. 1998, Rodríguez-Ramírez & Clemente 2002). En él destacan, por su permanencia, dos grandes lagunas, la Laguna de Santa Olalla y la Laguna Dulce. En las proximidades nos encontramos una gran densidad de lagunas y charcas temporales que conforman un sistema de medios acuáticos extremadamente rico y diverso. El principal aporte hidrológico de este complejo son las precipitaciones, que juegan un papel esencial en la dinámica de este tipo de ecosistemas.



En “La Vera” convergen la marisma y las arenas o cotos en un estrecho ecotono (de 200 m a >1 km) que se extiende en dirección Norte-Sur. Se trata de un ecosistema de gran riqueza biológica, en el que la presencia de agua sub-terránea muy cercana a la superficie permite la existencia de una vegetación más exigente en humedad, manteniéndose incluso durante la estación seca. En ella son características las extensas praderas que en algunas zonas desarrollan en invierno densos helechales. La comunidad de alcornos dispuesta a lo largo de la Vera permite la nidificación de grandes colonias de garzas, espátulas y cigüeñas (garcillas *Bubulcus ibis*, garcetas *Egretta garzetta*, garzas reales *Ardea cinerea*, martinetes *Nycticorax nycticorax*, espátulas *Platalea leucorodia*, cigüeñas blancas) que forman las denominadas “Pajareras” de Doñana, merecedoras de un gran interés en cuanto a gestión y conservación debido a su singularidad y diversidad biológica. Esta es otra de las zonas de reproducción y alimentación preferida por los milanos negros, y donde se producen las mayores concentraciones de herbívoros (Valverde 1958).

A modo de resumen, la singularidad ecológica del área de estudio se refleja en la diversidad de sus ecosistemas; Doñana aloja 803 especies de flora y 458 especies de fauna. La fauna vertebrada está compuesta por siete especies de peces de agua dulce, 30 especies de peces de estuario, 12 de anfibios, 19 de reptiles, 29 de mamíferos y 361 especies de aves.

Clima

El clima en la región es de tipo Mediterráneo subhúmedo con influencia atlántica (Castroviejo 1993). La temperatura media anual es de, aproximadamente, 17°C, con veranos muy calurosos en los que se alcanzan temperaturas altas, con medias alrededor de los 25°C, aunque las máximas pueden aproximarse a los 35° ó 40°C. Por el contrario, los inviernos son suaves, siendo raros los días en los que la temperatura desciende bajo cero. El mes más frío es Enero, con una temperatura media alrededor de los 10°C.

La precipitación media anual es de unos 550 mm, aunque existen importantes diferencias interanuales (datos procedentes de la estación meteorológica del Palacio de Doñana entre los años 1978 y 2004). En los años muy lluviosos, la cantidad de precipitación puede superar los 1000 mm, mientras que en años muy secos, esa misma cantidad puede hallarse por debajo de los 300 mm. El período más húmedo es el otoño, cuando el área recibe casi la mitad de las precipitaciones anuales. El invierno y la primavera pueden ser también lluviosos, concentrando el 30% y el 20% respectivamente de las precipitaciones anuales, ya que no es frecuente



que llueva durante el verano. No obstante, la distribución de las precipitaciones también presenta una notable variabilidad.

ESPECIES Y POBLACIONES ESTUDIADAS

El **milano negro** (*Milvus migrans*, familia Accipitridae) es una rapaz de talla media (630-941g), monógama, de elevada longevidad y ampliamente distribuida por las regiones templadas, tropicales y subtropicales del Viejo Mundo y Australasia. Posee un marcado carácter migrador, y se distribuye por gran parte de Europa durante la estación de cría, pasando los inviernos en el África subsahariana (Cramp & Simmons 1980; Del Hoyo et al. 1994). En la Península Ibérica ocupa una gran diversidad de hábitats, aunque nidifica preferentemente en arboledas próximas a zonas húmedas (como vegas fluviales, embalses, lagos y marismas), pastizales y dehesas. El grueso de la población reproductora se asienta en los valles del Duero, Tajo, Guadiana y Guadalquivir, y las concentraciones máximas se producen en las marismas de Doñana (Blas 2002).

A finales de Febrero o comienzos de Marzo se producen las primeras observaciones de milanos negros en Doñana, donde las parejas reproductoras (en torno a 600; Blas 2002) construyen sus nidos sobre alcornoques, pinos o eucaliptos localizados preferentemente en el borde de la marisma o en los parches de bosque mediterráneo situados en el norte del Parque Nacional (i.e., Matagordas), donde la agregación de territorios alcanza los valores máximos descritos para esta especie (Forero et al. 2002). La construcción del nido es realizada conjuntamente por ambos sexos, y la puesta se compone de 1-3 huevos (excepcionalmente cuatro) que incuba principalmente la hembra durante 30-32 días. En Doñana, las puestas se concentran en la segunda quincena de Abril, aunque pueden ocurrir desde finales de Marzo y prolongarse hasta mediados de Junio en los casos más extremos (Viñuela 1993).

Aunque esta especie posee un ligero dimorfismo sexual de talla (hembras mayores que los machos; Cramp & Simmons 1980), ambos sexos son similares en apariencia externa y coloración. El comportamiento reproductor muestra, sin embargo, una marcada segregación sexual en las tareas parentales: la hembra se ocupa de la incubación y gran parte de la crianza de los pollos en nido, mientras que el macho aporta la práctica totalidad del alimento que consume su pareja y su progenie desde los 20 días previos a la puesta. La estancia de los pollos en nido dura entre 5 y 6 semanas, y el período de independencia juvenil es de 30-35 días (Bustamante & Hiraldo 1989).

En la población de estudio las parejas reproductoras tienden a mantenerse unidas de por vida, y a ocupar el mismo territorio año tras año. Cuando fracasan en la reproducción y/o muere la pareja de años previos, tienden a dispersarse hacia otros territorios pero siempre dentro del área de estudio (Forero et al. 2002).

El generalismo trófico del milano negro, unido a sus hábitos oportunistas, configuran una de las dietas más variadas entre las rapaces. En Doñana, los milanos aprovechan las fluctuaciones de agua en la marisma para capturar peces y cangrejos, juveniles de fochas, anátidas y larolimícolas, y en determinadas zonas gazapos y conejos, seleccionando generalmente ejemplares enfermos o con poca capacidad defensiva (Delibes 1975; Espina 1982; Valverde 1960, 1967; Veiga & Hiraldo 1990). El cleptoparasitismo (sobre congénéricos, águilas calzadas y milanos reales principalmente) y la utilización de carroña son otros recursos tróficos habituales en esta población (Espina 1982). Las parejas reproductoras ajustan la composición de su dieta a la disponibilidad de presas en el entorno de nidificación (Espina 1982; Viñuela et al. 1994).

La partida hacia las zonas de invernada se produce durante los meses de Julio y Agosto, coincidiendo con las mayores concentraciones de paso migratorio a través del estrecho de Gibraltar (Bernis 1980). Las recuperaciones invernales sitúan en el Golfo de Guinea el área de invernada para la población de estudio (Chad, Ghana, Guinea Ecuatorial; Blas 2002), que muestra unas elevadas tasas de supervivencia adulta (75%, Forero et al. 1999) y longevidades máximas de 21 años (Blas 2002). Aunque se trata de la rapaz más abundante en términos globales (Del Hoyo et al. 1994), a nivel peninsular existen evidencias de un declive poblacional durante las pasadas décadas en Portugal (Palma 1985) y gran parte de España (Blas 2002). Las principales amenazas son el uso de venenos, la destrucción del hábitat, la electrocución en tendidos eléctricos, y los contaminantes, a los que esta especie es muy sensible (Blanco et al. 2003), tanto por su modo de obtención de alimento (caza de individuos enfermos o debilitados, uso de vertederos, carroñas), como por su hábitat óptimo asociado a cursos de agua, zonas húmedas y vertederos (Madroño et al. 2004). El milano negro ha pasado de estar considerado “No Amenazado” en el Libro Rojo de 1992 (Blanco & González 1992) a “Casi Amenazado”, debido a la estimación actual de parejas nidificantes (no superior a 5000) y a las tendencias regresivas detectadas durante las últimas décadas en las poblaciones mejor conocidas que hace sospechar un declive del conjunto de la población de como mínimo el 10% de las tres últimas generaciones (18 años).

La **cigüeña blanca** (*Ciconia ciconia*, familia Ciconiidae) es una especie de ave Ciconiiforme de gran tamaño (3100-3600g) y larga vida, ampliamente distribuida por

África y Europa (Del Hoyo 1994). De carácter migrador, la población reproductora en la Península Ibérica pasa los inviernos en la zona del Sahel africano, (área de inundación del río Níger, Malí hasta el norte de Nigeria) (Cramp & Simmons 1980). Ocupa una gran diversidad de hábitats, siendo fácilmente observable en lugares abiertos y despejados de pastos, dehesas o cultivos en amplias vegas fluviales, arrozales, y zonas de marisma. Construye sus nidos en la parte alta de árboles, o de construcciones humanas como torres de iglesias, postes eléctricos, chimeneas, etc. En la Península Ibérica, las concentraciones máximas de reproductores se asientan en nuestra zona de estudio, siendo la Dehesa de Abajo, con más de 300 parejas el núcleo reproductor más numeroso en el Paleártico Occidental (Jovani & Tella 2004).

A finales de Enero o principios de Febrero se producen las primeras observaciones de cigüeñas blancas en la Dehesa de Abajo, si bien durante los últimos años una fracción cada vez más grande de la población tiende a permanecer en las marismas durante los meses de invierno, hecho que probablemente esté relacionado con unas condiciones meteorológicas cada vez más favorables y una mayor disponibilidad de alimento a lo largo de todo el año (Gordo & Sanz 2006).

En la Dehesa de Abajo las parejas reproductoras construyen sus nidos principalmente sobre acebuches, también sobre encinas y algún eucalipto presente en la zona. Aunque esta especie posee un ligero dimorfismo sexual de talla (machos mayores que las hembras; Cramp & Simmons 1980), ambos sexos son similares en apariencia externa y coloración. La construcción del nido es realizada conjuntamente por la pareja, e iniciada por el primer miembro en regresar a la zona de cría, normalmente el macho. La puesta media es de 3-4 huevos (rango 1-7; Cramp & Simmons 1980) que son incubados por ambos sexos durante 33-34 días. Del mismo modo, ambos miembros de la pareja se encargan del cuidado y la alimentación de los pollos, que permanecen en el nido durante 58-64 días. Los volantones adquieren independencia en torno a los 90 días de edad. La partida hacia los lugares de invernada en el África subsahariana se produce durante los meses de Julio y Agosto, cuando se dan grandes concentraciones de paso migratorio a través del estrecho de Gibraltar.

Las parejas reproductoras suelen alimentarse en el entorno de la zona de nidificación y su dieta es muy variada: insectos y otros invertebrados, larvas de insectos (especialmente de Coleópteros y Ortópteros), peces, anfibios, reptiles, pequeños roedores y algunos juveniles de aves. No obstante, el mayor recurso trófico de las cigüeñas en la Dehesa de Abajo es el cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*) (Negro et al. 2000), una especie invasora introducida en las marismas del Guadalquivir en la década de los 70 y que hoy en día constituye una



pieza clave en la dieta de numerosas especies predadoras de este ecosistema (Tablado et al. 2010). Precisamente la abundancia de este recurso trófico en las marismas y arrozales próximos a la Dehesa de Abajo posibilitó el crecimiento de este núcleo reproductor incluso cuando el número de cigüeñas en el resto de la Península Ibérica sufría un acusado descenso durante la década de los 80. Actualmente ha mejorado su estado de conservación en comparación con la situación de 1992 (Blanco & González 1992), pasando de considerarse en el segundo nivel de amenaza (Vulnerable) a una situación de “No Amenaza” (IUCN 2013).

TRABAJO DE CAMPO

Seguimiento de parámetros reproductivos y obtención de muestras de sangre

Desde el establecimiento de los primeros nidos de **cigüeña** en la Dehesa de Abajo a comienzos de los años ochenta se ha venido controlando el número de pollos que conseguían volar de ellos, marcándose con anillas de plástico blanco grabadas con un código alfanumérico único de 3 ó 4 dígitos en color negro. Este marcaje en nido ha permitido, posteriormente, la identificación de individuos a distancias de 20-300 m mediante la utilización de telescopios terrestres de 20-120 aumentos, y ha generado información sobre las tasas de retorno, emparejamientos, sexo y estatus reproductor de un gran número de individuos. Aunque el esfuerzo de marcaje no ha sido el mismo a lo largo de todo el período de seguimiento, desde 1998, tras el accidente minero, se ha procurado individualizar todos los ejemplares nacidos en la Dehesa de Abajo. En la primavera siguiente al vertido (1999), se inició el seguimiento reproductor individualizado de la población, controlando especialmente la reproducción de aquellas parejas en las que al menos uno de sus miembros portaba una anilla de plástico. Las estimas de productividad se obtuvieron mediante el control periódico (Febrero-Julio) de los nidos ocupados y la observación de su contenido al menos en tres ocasiones a lo largo de la estación reproductora, normalmente mediante el uso de un espejo unido al final de un palo largo que permitía de una manera rápida observar el contenido del nido sin causar molestias innecesarias. En todos los nidos (independientemente de que los adultos reproductores estuvieran o no marcados) se registró el tamaño de puesta, el número de eclosiones y el número de pollos volados. Los pollos se marcaron a una edad de 32-34 días, y fueron

pesados y medidos para estimar su condición física (ver *Material y Métodos* en capítulos correspondientes), además de tomar las muestras de sangre necesarias para cada estudio según se detalla más abajo en el texto y en los capítulos correspondientes de esta tesis.

El seguimiento de la población de **milanos negros** en Doñana se inició en 1964, pocos meses después de la creación de la Reserva Biológica. Inicialmente se realizaron censos anuales de la población reproductora y anillamientos parciales de los pollos, y con el paso de los años se ha aumentado progresivamente el esfuerzo de seguimiento ampliando el área de estudio e implementando técnicas de marcaje, control y registro de parámetros reproductivos hasta la actualidad (Blas 2002). Parte del trabajo de campo realizado durante esta tesis ha sido una continuación del seguimiento de fondo de la población (p.ej., marcaje de individuos adultos y pollos; seguimiento de parámetros reproductivos), aumentando el esfuerzo en los aspectos de muestreo más relevantes para cada estudio (p.ej., obtención de muestras de sangre) y realizando, además, tests específicos (p.ej., estimación de la respuesta inmune celular) que se han detallado en los capítulos correspondientes.

Aunque en esta tesis sólo se han estudiado los niveles de metales en pollos de milano negro, también se tomaron y analizaron muestras de sangre con la misma finalidad en el caso de los ejemplares adultos capturados mediante red-cañón.

La metodología empleada para el procesamiento y conservación de las muestras de sangre, tanto en milanos como en cigüeñas, dependió de la finalidad de las mismas. En todos los casos, se recolectaron 1-2 gotas de sangre en 1 ml de etanol puro para determinar el sexo mediante técnicas moleculares (Ellegren 1996). Las muestras de sangre recolectadas para determinar metales (1-3 alícuotas, 1.5-2 ml cada una) se depositaron en tubos heparinizados que eran transferidos *in situ* a neveras con hielo seco o contenedores con nitrógeno líquido y posteriormente congeladas (-80 °C) hasta el momento de su análisis. En el caso de las cigüeñas, las muestras de sangre tomadas para análisis de hormonas y bioquímica plasmática (1-3 ml) se depositaron igualmente en tubos heparinizados dentro de una nevera con hielo (-20 °C) para ser centrifugadas el mismo día de la captura (3000 rpm), congelando posteriormente el plasma (-80 °C) hasta el momento de su análisis. Para la evaluación del daño en el ADN (ensayo del cometa), las muestras de sangre (1 ml) se depositaron en tubos con EDTA que fueron conservados en neveras con hielo (-20 °C) hasta la llegada al laboratorio para su procesamiento a lo largo del mismo día de muestreo.

CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

Aunque los vertidos tóxicos, o cualquier otra perturbación ambiental que pueda recibir el calificativo de desastre ecológico, constituyen en sí un problema independientemente del lugar en el que se produzcan, su relevancia es aún mayor cuando ocurren en zonas de alto valor ecológico como es el caso de Doñana. Desde el punto de vista de la conservación medioambiental, sus potenciales efectos sobre los ecosistemas que forman parte de este tipo de espacios representan una grave amenaza que es necesario estudiar. No obstante, el carácter de protección que suele acompañar a estas zonas y a las especies que las utilizan como lugar de reproducción, invernada o paso en sus migraciones supone un hándicap para la investigación, ya que condiciona y en cierto modo limita los posibles estudios que pueden llevarse a cabo dentro de ese marco de protección.

En este contexto, esta tesis contaba *a priori* con una serie de limitaciones o particularidades en cuanto a diseño y ejecución que se exponen brevemente a continuación.

Muestreo no destructivo

El muestreo no destructivo era un requisito fundamental para poder abordar esta tesis en un espacio protegido y emblemático como Doñana, además del único que permitía plantear hipótesis de trabajo a medio-largo plazo relacionadas con la exposición y posibles efectos de la contaminación a nivel de individuo (p.ej., reproducción y supervivencia). Sin embargo, cuando ocurrió el vertido, la práctica de este tipo de muestreo en fauna silvestre (p.ej., sangre, plumas), aunque demandada (Fossi 1994), era aún incipiente, por lo que la información disponible en cuanto a metodología analítica, y más importante aún, en lo que respecta a interpretación de niveles de exposición y efectos asociados, era todavía escasa.

Metodología analítica: Consistencia y repetibilidad entre laboratorios

En las fechas en las que ocurrió el vertido, sólo algunos laboratorios del CSIC contaban con los medios y la metodología necesarios para poder abordar con garantías el análisis de metales pesados y metaloides en una cantidad ingente de muestras de sangre. Además, la urgencia de resultados dadas las características del accidente y

el potencial riesgo para la salud, tanto del ecosistema como de la población humana asentada en la zona (actividad cinegética, agricultura, etc.), hicieron necesario contar con más de un laboratorio para llevar a cabo el análisis de las muestras que después se han utilizado en la mayor parte de los capítulos-artículos que forman esta tesis. Paralelamente se analizaron muchas otras muestras cuyos resultados han sido publicados en artículos científicos (ver Anexo en CD) y en los sucesivos informes que hizo públicos el CSIC en los primeros meses/años posteriores al accidente.

El Instituto de Química Orgánica General (IQOG), y el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) fueron los centros del CSIC en cuyos laboratorios se realizaron los análisis de metales pesados y metaloides en sangre de aves. Aunque ambos laboratorios utilizaron metodologías similares, protocolos estandarizados y muestras de referencia en sus análisis, tras realizar una comparación entre los resultados ofrecidos por cada uno de ellos para fracciones de una misma muestra (comparativa interlaboratorios) se llegó a la conclusión de que los resultados no eran comparables entre laboratorios para todos los metales analizados, y para los que sí lo eran (p.ej., el Pb) se hacía necesario aplicar un factor de corrección. La descripción detallada del estudio y de cómo se solventó el problema para poder analizar la evolución temporal de los niveles de metales en sangre y su relación con algunas de las respuestas biológicas o biomarcadores utilizados aparece en el Capítulo 1 de esta tesis, y se menciona también en el Capítulo 2.

Aunque en los estudios ecotoxicológicos es relativamente frecuente que el análisis de muestras se lleve a cabo en más de un laboratorio, sobre todo cuando esos estudios versan sobre patrones temporales (evolución en el tiempo de los niveles de contaminantes o respuestas de biomarcadores) o espaciales, y/o existen problemas logísticos relacionados, por ejemplo, con el transporte y conservación de las muestras, no lo es tanto que se estudie en profundidad si los datos proporcionados por diferentes laboratorios son comparables entre sí (p.ej., Esler et al. 2010, 2011; Miller et al. 1998). La verificación de repetibilidad analítica entre laboratorios resulta crucial, pues de otro modo es posible obtener resultados engañosos y conclusiones poco fiables en cuestiones tales como variaciones geográficas o evolución temporal de la exposición a contaminantes.

Umbrales de toxicidad. Efectos subletales

Extrapolaciones en campo y laboratorio. Mezclas e interacciones

La relativa ausencia de trabajos publicados sobre niveles de metales en sangre y su significado biológico en aves (exceptuando el caso del Pb, p.ej., Franson 1996),

incluyendo umbrales de toxicidad y efectos subletales, dificultó la interpretación de los resultados. La extrapolación de: i) los resultados obtenidos a este respecto en experimentos con animales de laboratorio, y/o ii) los niveles y efectos publicados en otros trabajos con aves silvestres, se utilizaron como base para discutir los resultados encontrados en esta tesis. Ambas alternativas conllevan dificultades asociadas principalmente a las diferencias interespecíficas en cuanto a susceptibilidad y sensibilidad frente a la exposición y efectos de los contaminantes (Eeva & Lehtikoinen 1995; Karchner et al. 2006; Pappas et al. 2006; Rainio et al. 2013; Wilson et al. 2007). Además, en el caso de los estudios realizados en laboratorio, los animales son expuestos, por lo general, a un solo contaminante (o tipo de contaminante), la exposición se produce a dosis altas y durante períodos de tiempo cortos, utilizando muchas veces rutas de administración (exposición distintas a la dieta (o a la forma en que se ingiere el alimento; en muchas ocasiones la exposición está más relacionada con la ingestión de sedimento o suelo contaminado que con la del alimento en sí), que es la más frecuente vía de exposición en la naturaleza. Esto hace aún más difícil extrapolar los resultados derivados de tales experimentos a situaciones en las que la exposición es a una mezcla o cóctel de contaminantes (como ocurre en los vertidos), conocidos algunos y desconocidos otros, por lo general a dosis bajas y durante períodos de tiempo más largos, y que, además, pueden interaccionar entre sí dando lugar a efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos. Por otro lado, y en lo que respecta a la comparación con otros estudios en campo de especies cercanas, las condiciones ambientales normalmente varían de un estudio a otro, a veces incluso lo hacen para el mismo área de estudio cuando el trabajo se lleva a cabo en períodos o años distintos (p.ej., Bustnes et al. 2008) y lo mismo ocurre con las variables relacionadas con el individuo (condición física, edad, estado reproductor, etc.) e incluso con la población (con posibilidad de respuestas adaptativas - resistencia - a la exposición a contaminantes). Todo ello hace que la extrapolación de resultados entre estudios deba realizarse con cautela.

Los umbrales de toxicidad utilizados en esta tesis para valorar los niveles de metales encontrados y los posibles efectos asociados, sobre todo en el caso de los no esenciales, si bien han sido utilizados durante las pasadas dos décadas en los estudios ecotoxicológicos sobre fauna silvestre, también han sido objeto de discusión en publicaciones recientes por considerarlos demasiado elevados, sobre todo para algunas de las respuestas biológicas o biomarcadores aquí estudiados u otros relacionados (en relación al Pb ver, p.ej., Franson & Pain 2011; Martínez-Haro et al. 2011). En el caso de los seres humanos, la evidencia cada vez más numerosa de los efectos adversos del Pb en el sistema nervioso y la función cognitiva a edades tempranas ha llevado a considerar que no existe un



umbral por debajo del cual la exposición a este metal pueda considerarse inocua (Scheuhammer & Thomas 2011).

Estresores múltiples

Otro aspecto a destacar es que en el escenario actual de cambio global la fauna silvestre está experimentando un mayor nivel de estrés. Este escenario ligado a, entre otros: i) variaciones en la disponibilidad de alimento; ii) fenómenos meteorológicos adversos cada vez más extremos y aumento de las temperaturas; iii) introducción de especies invasoras, incluidos agentes patógenos y parásitos a los que no se ha estado expuesto anteriormente; iv) cambios en las relaciones predador-presa; y v) exposición a un creciente número y diversidad de contaminantes, especialmente a los de nueva generación como los retardantes de llama (PBDE, DP, etc.), PFOS, cosméticos y productos farmacológicos, a los que hay que sumar el legado de contaminantes persistentes liberados al medio desde el siglo pasado (pesticidas organoclorados, PCBs, dioxinas, furanos, etc.), añaden complejidad a una situación ambiental ya de por sí potencialmente adversa sin estas amenazas. Todas estas perturbaciones o factores de estrés, independientemente de su origen (antropogénico u otro), pueden condicionar el grado de exposición a los contaminantes (Jenssen 2006; Letcher et al. 2010; McKinney et al. 2009; Noyes et al. 2009) y modificar sus umbrales de toxicidad en relación a determinadas respuestas biológicas o biomarcadores; la combinación de estos cada vez más numerosos estresores ambientales junto con la exposición a contaminantes, incluso a niveles bajos, pueden provocar efectos adversos sobre los individuos y sus poblaciones por debajo del umbral de toxicidad establecido en condiciones controladas o en ausencia de estos factores de estrés (Bustnes et al. 2006, 2008; Gill & Elliott 2003; Holmstrup et al. 2010; Relyea & Mills 2001; Sih et al. 2004). Por ello, pronosticar la ausencia de efecto ante una determinada exposición basándose exclusivamente en un umbral de toxicidad derivado de estudios experimentales en ambientes controlados o en extrapolaciones de trabajos realizados con otras especies, taxonómicamente cercanas o no, en hábitats distintos, es cada vez más arriesgado y menos concluyente en un escenario de cambio global como en el que nos hayamos inmersos. Así parecen entenderlo un grupo cada vez más numeroso de investigadores en cuyos estudios los factores ambientales y ecológicos (p.ej., factores meteorológicos, disponibilidad y calidad de alimento, etc.) empiezan a cobrar mayor protagonismo por su potencial interacción con la exposición y efectos de los contaminantes (Bustnes et al. 2012; Eeva et al. 2010; Elliott et al. 1998, 2012; Gill & Elliott 2003; Hallinger & Cristol 2011; Hill et al. 2008; Hipfner et al. 2011). El papel de las variables ambientales

es cada vez más importante a la hora de analizar las fuentes y dinámicas de los contaminantes, incorporando eventualmente herramientas tales como los análisis de isótopos estables o perfiles de ácidos grasos (Burgess et al. 2013; Eulaers et al. 2013; Hebert & Weseloh 2006; Hipfner et al. 2011; Morrissey et al. 2004; Ofukany et al. 2012). Desafortunadamente, la literatura científica en este campo de investigación aún es relativamente escasa, sobre todo cuando se trata de fauna silvestre. Sin embargo, pese a la dificultad manifiesta de abordar este tipo de cuestiones, esta nueva realidad debe ser tomada muy en cuenta a la hora de llevar a cabo estudios ecotoxicológicos y de interpretar los resultados que en ellos se obtengan, sobre todo en ecosistemas especialmente sensibles a cualquiera de las perturbaciones asociadas al cambio climático (p.ej., el Ártico, o las zonas de la cuenca mediterránea) u otras.

Aproximación observacional en campo

El estatus de protección del Espacio Natural Doñana y de las especies utilizadas como centinelas en esta tesis derivó en el diseño de estudios observacionales para testar nuestras hipótesis de trabajo. La ausencia de estudios experimentales que confirmen los hallazgos obtenidos en campo constituye una de las principales limitaciones de esta tesis. Los estudios dosis-efecto en condiciones controladas hubieran aportado algo más de luz en la evaluación de la respuesta de los biomarcadores aquí utilizados y los efectos detectados. Sin embargo, si bien estos estudios pueden, en general, ayudar a determinar la causa y los mecanismos subyacentes a esos efectos, no es seguro que los resultados que se obtengan a partir de ellos coincidan con los encontrados en campo. Las condiciones en el laboratorio difícilmente pueden replicar lo que ocurre en la naturaleza, donde los individuos se hallan sometidos a una gran cantidad de estresores ambientales, incluidos otros contaminantes, que pueden interaccionar entre sí provocando respuestas diferentes a las obtenidas en cautividad (Burger & Gochfeld 2000; Heinz et al. 2012). Además, las ya mencionadas diferencias interespecíficas en cuanto a la sensibilidad o susceptibilidad a determinados contaminantes complica aún más la extrapolación de resultados. Aunque se barajó la posibilidad de extraer pollos de cigüeña del núcleo reproductor objeto de estudio para llevar a cabo estos experimentos, el estatus de protección de la especie y el de la zona afectada, junto con la ausencia de instalaciones adecuadas para llevar a cabo los experimentos necesarios a medio-largo plazo, y las dificultades logísticas asociadas (tiempo, personal, financiación) nos hicieron desistir del intento.

Para contrarrestar de algún modo esta limitación, y dados los resultados preliminares que se habían obtenido en cuanto a daños en el ADN y su potencial impacto sobre la eficacia biológica de los individuos, se intentó una aproximación experimental al efecto cóctel de contaminantes que representaba el vertido mediante la utilización de un modelo biológico más sencillo: microalgas (ver subapartado en *Síntesis. Discusión general. Estudios complementarios*; Baos et al. 2002).

REFERENCIAS

- Allier C et al. 1974. Mapa Ecológico de la Reserva Biológica de Doñana. División de Ciencias del CSIC. Estación Biológica de Doñana, Sevilla.
- Amat JA et al. 1979. Parque Nacional de Doñana. Mapa ecológico. Ministerio de Agricultura, Instituto para la Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Baos R et al. 2002. Short-term Adaptation of Microalgae in Highly Stressful Environments: An Experimental Model Analysing the Resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the Heavy Metals Mixture from the Aznalcóllar Mine Spill. *Eur J Phycol* 37: 593-600.
- Bernis F. 1980. *La Migración de las Aves en el Estrecho de Gibraltar*. Vol.1. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Blanco G et al. 2003. Factors Influencing Variability and Potential Uptake Routes of Heavy Metals in Black Kites Exposed to Emissions from a Solid-waste Incinerator. *Environ Toxicol Chem* 22(11): 2711-2718.
- Blanco JC, González JL. 1992. *Libro Rojo de los Vertebrados de España*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed), Madrid.
- Blas J. 2002. Edad y Reproducción en el Milano Negro (*Milvus migrans*). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Burger J, Gochfeld M. 2000. Effect of Lead on Birds (Laridae): A Review of Laboratory and Field Studies. *J Toxicol Environ Health* (B) 3(2): 59-78.
- Burgess NE et al. 2013. Mercury Trends in Herring Gull (*Larus argentatus*) Eggs from Atlantic Canada, 1972-2008: Temporal Change or Dietary Shift? *Environ Poll* 172: 216-222.
- Bustamante J, Hiraldo F. 1989. Post-fledging Dependence Period and Maturation of Flight Skills in the Black Kite *Milvus migrans*. *Bird Study* 36: 199-204.
- Bustnes JO et al. 2012. Temporal Dynamics of Circulating Persistent Organic Pollutants in a Fasting Seabird under Different Environmental Conditions. *Environ Sci Technol* 46: 10287-10294.
- Bustnes JO et al. 2008. The Potential Impact of Environmental Variation on the Concentrations and Ecological Effects of Pollutants in a Marine Avian Top Predator. *Environ Int* 34(2): 193-201.
- Bustnes JO et al. 2006. Anti-parasite Treatment Removes Negative Effects of Environmental Pollutants on Reproduction in an Arctic Seabird. *Proc R Soc Lond B* 237: 3117-3122.
- Castroviejo J. 1993. Memoria. Mapa del Parque Nacional de Doñana, escala 1/50000. CSIC y Agencia de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Clemente L et al. 1998. *Los Suelos del Parque Nacional de Doñana*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid.
- Cramp S, Simmons KEL. 1980. *The Birds of the Western Palearctic*. Oxford University Press (Ed), Oxford, UK.
- Del Hoyo J et al. 1994. *Handbook of the Birds of the World*. Lynx Edicions, Barcelona.
- Delibes M. 1975. Alimentación del Milano Negro (*Milvus migrans*) en Doñana (Huelva, España). *Ardeola* 21(1): 183-207.
- Eeva T, Lehtikoinen E. 2010. Polluted Environment and Cold Weather Induce Laying Gaps in Great Tits and Pied Flycatcher. *Oecologia* 162(2): 533-539.
- Eeva T, Lehtikoinen E. 1995. Egg Shell Quality, Clutch Size and Hatching Success of the Great Tit (*Parus major*) and the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) in an Air Pollution Gradient. *Oecologia* 102: 312-323.

- Ellegren H. 1996. First Gene on the Avian W Chromosome (CHD) Provides a Tag for the Universal Sexing of Non-ratite Birds. *Proc R Soc Lond B* 263: 1635-1641.
- Elliott JE et al. 2012. Factors Influencing Legacy Pollutant Accumulation in Alpine Osprey: Biology, Topography, or Melting Glaciers? *Environ Sci Technol* 46: 9681-9689.
- Elliott JE et al. 1998. Variable Reproductive Success of Bald Eagles on the British Columbia Coast. *J Wild Manage* 62(2): 518-529.
- Esler D et al. 2011. Cytochrome P4501A Biomarker Indication of the Timeline of Chronic Exposure of Barrow's Goldeneyes to Residual Exxon Valdez Oil. *Mar Poll Bull* 62(3): 609-614.
- Esler D et al. 2010. Cytochrome P4501A Biomarker Indication of Oil Exposure in Harlequin Ducks Up to 20 Years After the Exxon Valdez Oil Spill. *Environ Toxicol Chem* 29(5): 1138-1145.
- Espina J. 1982. Variaciones en la Alimentación de una Población de Milanos Negros (*Milvus migrans*). Tesis de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
- Eulaers I et al. 2013. Ecological and Spatial Factors Drive Intra- and Interspecific Variation in Exposure of Subarctic Predatory Bird Nestlings to Persistent Organic Pollutants. *Environ Int* 57-58: 25-33.
- Forero MG et al. 2002. Causes and Fitness Consequences of Natal Dispersal in a Population of Black Kites. *Ecology* 83: 858-872.
- Forero MG et al. 1999. Causes and Consequences of Territory Changes and Breeding Dispersal Distances in the Black Kite. *Ecology* 80: 1298-1310.
- Fossi MC. 1994. Nondestructive Biomarkers in Ecotoxicology. *Environ Health Perspect* 102(Suppl.12): 49-54.
- Franson JC. 1996. Interpretation of Tissue Lead Residues in Birds Other than Waterfowl. En: *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. Beyer NW, Heinz GH, Redmon-Norwood AW (Eds). Lewis, Boca Raton (FL), USA, pp. 265-279.
- Franson JC, Pain DJ. 2011. Lead in Birds. En: *Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations*. Beyer NM, Meador JP (Eds). CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton (FL), USA, pp. 563-593.
- García L et al. 2000. *Prontuario de las Aves de Doñana. Anuario Ornitológico de Doñana*. Estación Biológica de Doñana, Ayuntamiento de Almonte (Eds). Almonte (Huelva).
- García Novo F, Marín Cabrera C. 2006. *Doñana Agua y Biosfera*. Doñana 2005, Confederación Hidrográfica del Guadalquivir, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp. 69-86.
- García Novo F et al. 1978. *Doñana: Prospección e inventario de ecosistemas*. Ministerio de Agricultura, Instituto para la Conservación de la Naturaleza. Monografía nº 18.
- Gill CE, Elliott JE. 2003. Influence of Food Supply and Chlorinated Hydrocarbon Contaminants on Breeding Success of Bald Eagles. *Ecotoxicology* 12: 95-111.
- Gordo O, Sanz JJ. 2006. Climate Change and Bird Phenology: A Long-term Study in the Iberian Peninsula. *Global Change Biol* 12: 1993-2004.
- Hallinger KK, Cristol DA. 2011. The Role of Weather in Mediating the Effect of Mercury Exposure on Reproductive Success in Tree Swallows. *Ecotoxicology* 20(6): 1368-1377.
- Hebert CE, Weseloh DV. 2006. Adjusting for Temporal Change in Trophic Position Results in Reduced Rates of Contaminant Declines. *Environ Sci Technol* 40: 5624-5628.
- Heinz GH et al. 2012. A Comparison of the Teratogenicity of Methylmercury and Selenomethionine Injected Into Bird Eggs. *Arch Environ Cont Toxicol* 62(3): 519-528.
- Hill EF et al. 2008. Mercury and Drought Along the Lower Carson River, Nevada: II. Snowy Egret and Black-crowned Night-heron Reproduction on Lahontan Reservoir, 1997-2006. *Ecotoxicology* 17: 117-131.

- Hipfner JM et al. 2011. Ecological Factors Differentially Affect Mercury Levels in Two Species of Sympatric Marine Birds of the North Pacific. *Sci Tot Environ* 409(7): 1328-1335.
- Holmstrup M et al. 2010. Interactions between Effects of Environmental Chemicals and Natural Stressors: A Review. *Sci Tot Environ* 408(18): 3746-3762.
- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. Disponible en: <www.iucn-redlist.org>.
- Jenssen BM. 2006. Endocrine-disrupting Chemicals and Climate Change: A Worst Case Combination for Arctic Marine Mammals and Seabirds? *Environ Health Perspect* 114(Suppl.1): 76-80.
- Jovani R, Tella JL. 2004. Age-related Environmental Sensitivity and Weather Mediated Nestling Mortality in White Storks (*Ciconia ciconia*). *Ecography* 27: 611-618.
- Karchner SI et al. 2006. The Molecular Basis for Differential Dioxin Sensitivity in Birds: Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Proc Nat Acad Sci USA* 103(16): 6252-6257.
- Letcher RJ et al. 2010. Exposure and Effects Assessment of Persistent Organohalogen Contaminants in Arctic Wildlife and Fish. *Sci Tot Environ* 408(15): 2995-3043.
- Madroño A, González, C, Atienza, JC. 2004. *Libro Rojo de las Aves de España*. Dirección General para la Biodiversidad-SEO/Birdlife. Madrid.
- Martínez-Haro M et al. 2011. Effects of Lead Exposure on Oxidative Stress Biomarkers and Plasma Biochemistry in Waterbirds in the Field. *Environ Res* 111(4): 530-538.
- McKinney MA et al. 2009. Sea ice-Associated Diet change Increases the Levels of Chlorinated and Brominated Contaminants in Polar Bears. *Environ Sci Technol* 43(12): 4334-4339.
- Miller MJR et al. 1998. A Comparison of Blood Lead Levels in Bald Eagles from Two Regions on the Great Plains of North America. *J Wild Dis* 34(4): 407-714.
- Montes C et al. 1998. *Reconomicimiento Biofísico de Espacios Naturales Protegidos. Doñana: Una Aproximación Ecosistémica*. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Morrissey CA et al. 2004. Linking Contaminant Profiles to the Diet and Breeding Location of American Dippers Using Stable Isotopes. *J Appl Ecol* 41: 502-512.
- Negro JJ et al. 2000. Diet Explains Interpopulation Variation of Plasma Carotenoids and Skin Pigmentation in Nestling White Storks. *Physiol Biochem Zool* 73: 97-101.
- Noyes PD et al. 2009. The Toxicology of Climate Change: Environmental Contaminants in a Warming World. *Environ Int* 35: 971-986.
- Ofukany AFA et al. 2012. Connecting Breeding and Wintering Habitats of Migratory Piscivorous Birds: Implications for Tracking Contaminants (Hg) Using Multiple Stable Isotopes. *Environ Sci Technol* 46: 3263-3272.
- Pain DJ et al. 2009. A Global Update of Lead Poisoning in Terrestrial Birds from Ammunition Sources. En: *Ingestion of Lead from Spent Ammunition: Implications for Wildlife and Humans*. The Peregrine Fund, Boise, Idaho, USA, pp. 99-118.
- Palma L. 1985. Present Situation of Birds of Prey in Portugal. En: *Conservation Studies of Raptors*. Newton I, Chancellor RD (Eds), Cambridge ICPB, pp. 3-14.
- Pappas AC et al. 2006. Interspecies Variation in Yolk Selenium Concentrations among Eggs of Free-living Birds: The Effect of Phylogeny. *J Trace Elem Med Biol* 20(3): 155-160.
- Rainio MI et al. 2013. Oxidative Status in Nestlings of Three Small Paserine Species Exposed to Metal Pollution. *Sci Tot Environ* 454/455: 466-473.
- Ramos B. 2002. Ecosistemas. En: *Parque Nacional de Doñana*. García Canseco V. (Ed), Canseco Editores SL, Talavera de la Reina, pp. 69-108.

- Relyea RA, Diecks N. 2008. An Unforeseen Chain of Events: Lethal Effects of Pesticides on Frogs at Sublethal Concentrations. *Ecol Appl* 18(7): 1728-1742.
- Rodríguez-Ramírez A, Clemente L. 2002. Geomorfología. En: *Parque Nacional de Doñana*. García Canseco V. (Ed), Canseco Editores SL, Talavera de la Reina, pp. 19-42.
- Scheuhammer AM, Thomas VG. 2011. Eliminating Lead from Recreational Shooting and Angling: Relating Wildlife Science to Environmental Policy and Regulation in North America. En: *Wildlife Ecotoxicology: Forensic Approaches*. Elliott JE, Bishop CA, Morrissey CA (Eds). Springer, USA, pp. 359-382.
- Sih A et al. 2004. Two Stressors Are Far Deadlier Than One. *Trends Ecol Evol* 19(6): 274-276.
- Siljeström PA et al. 1994. *J Arid Environ* 26: 315-323.
- Tablado Z et al. 2010. The Paradox of the Long-term Positive Effects of a North American Crayfish on a European Community of Predators. *Conserv Biol* 24: 1230-1238.
- Valverde JA. 1967. *Estructura de una Comunidad de Vertebrados Terrestres*. Monografías de la Estación Biológica de Doñana. Vol. 1 (CSIC), Madrid.
- Valverde JA. 1960. Vertebrados de las Marismas del Guadalquivir. *Archiv Inst Aclimatación Almería*, 9: 1-169.
- Valverde JA. 1958. *British Birds*, 51: 1-23.
- Veiga JP, Hiraldo F. 1990. Food Habits and the Survival and Growth of the Nestlings of Two Sympatric Kites (*Milvus milvus* and *Milvus migrans*). *Holarctic Ecol* 13: 62-71.
- Viñuela J. 1993. Variación en la Fecha de Puesta de una Población de Milano Negro *Milvus migrans*: El Efecto de la Experiencia de los Reproductores. *Ardeola* 40:55-63.
- Viñuela J et al. 1994. Nesting Dispersion of a Black Kite Population in Relation to Location of Rabbit Warrens. *Can J Zool* 72: 1680-1683.
- Wilson HM et al. 2007. Coupling Contaminants with Demography: Effects of Lead and Selenium in Pacific Common Eiders. *Environ Toxicol Chem* 26 (7): 1410-1417.

CAPÍTULO 1



Relationships between T-Cell-Mediated Immune Response and Pb, Zn, Cu, Cd, and As Concentrations in Blood of Nestling White Storks (*Ciconia ciconia*) and Black Kites (*Milvus migrans*) from Doñana (Southwestern Spain) after the Aznalcóllar Toxic Spill

Raquel Baos¹, Roger Jovani¹, Manuela G. Forero¹, José L. Tella¹, Gemma Gómez², Begoña Jiménez², María J. González², and Fernando Hiraldo¹

¹ Department of Applied Biology, Estación Biológica de Doñana (C.S.I.C.), Avda. M^a Luisa s/n Pabellón del Perú, 41013 Sevilla, Spain

² Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry (C.S.I.C.), Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, Spain

ABSTRACT

In the Aznalcóllar mining accident (April 1998), nearly six million cubic meters of toxic wastes were spilled in the surroundings of the Doñana National Park (southwestern Spain). The present study focused on the likely effects of metal pollution on the immune system of nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) sampled in the nearby area. Using the phytohaemagglutinin skin test, we examined cell-mediated immune response (CMI) in relation to Pb, Zn, Cu, Cd, and As concentrations in blood of 281 nestling white storks and of 89 black kites. The former species was monitored along a four-year period (1999, 2001–2003), while black kites were sampled in 1999. Overall, average levels of heavy metals and As were relatively low when compared to those reported for birds in metal-polluted areas. Copper showed a negative effect on CMI in both species, although the relationship was significant only for white storks in 2002. We found no evidence that environmental exposure to Pb, Zn, As, and Cd had any effect on nestlings' CMI. Interannual consistency is revealed as an important factor, supporting the need of long-term studies when assessing the immunotoxic effects of metal exposure in the wild.

Key Words: Immune response Heavy metals White stork Black kite Aznalcóllar

INTRODUCTION

On April 25, 1998, the rupture of the tailings dam at the Aznalcóllar mine (Sevilla, south-western Spain) released approximately two million cubic meters of pyrite sludge and four million cubic meters of acidic water into the Agrio-Guadiamar river system. The acidic wastes flooded more than 4,000 hectares of riverbanks and adjacent land, threatening an ecologically sensitive area, the Doñana National Park, the largest reserve of bird species in Europe and last refuge for some globally threatened wildlife species [1].

The slurry spilled contained potentially highly toxic elements such as Pb, Zn, As, Cu, Cd, and other sulfide-related trace elements [1]. In May 1998, an emergency plan was enforced to handle the Aznalcóllar accident that involved mechanical removal of the mud slurry, remediation of polluted soils, and neutralization of the acidic water that had been retained in the border of the national park [2]. Moreover, the ecological sensitivity of the area promoted a long-term monitoring plan to assess the biological effects of the toxic spill on Doñana ecosystems. In this regard, the use of sentinel animals on wetlands of concern provides valuable information about ecosystem sustainability that is complementary to the ongoing routine toxicity testing focusing on aquatic flora and fauna. Birds are highly visible components of wetland ecosystems, and, since they are in a position to reflect the integrated effects of contaminants through their trophic relationships, avifauna often are ideal indicator species for assessing the environmental health of specific areas of concern.

At present, logistical considerations limit the ability of researchers to conduct long-term studies that would directly link the survival of birds to their contaminants burdens. However, the use of biomarkers provides a reasonable alternative to such studies. Bio-

markers are valuable tools because they integrate multiple factors (e.g., chemical bioavailability, individual susceptibility, effects from multiple contaminants, etc.) that can influence a response to contaminant exposure and provide insight into the health status of individuals and populations [3]. For this reason, biomarkers have been used routinely in recent years to assess the health of wildlife in relation to their exposure to pollutants [2,4].

Immune function is one important indicator of the general state of health of individuals and has been proven as a sensitive biomarker of contaminant exposure when compared to other measures of animal health [5]. Adverse effects of toxicants on the immune system occur at concentrations well below that required for overt signs of toxicity and can also persist long after other measures of toxicity are no longer present. Therefore, the potential exists for immune function tests to be useful as sensitive, early-warning, and long-lasting indicators of toxicity.

Several studies have shown immune response to be compromised in birds exposed to metals ([6] and references therein). However, most of the information that relates immune response and exposure to metals comes from laboratory-based experiments involving conventional laboratory species being exposed to single trace elements. Very few studies attempt to assess the immunotoxic effects of metals in the wild. Field measurements of immune response represent a greater challenge compared to laboratory studies because of the larger range of antigenic challenges that any individual in the wild might experience. This, plus the genetic factors (e.g., heterozygosity) within wild populations, reduces the likelihood of finding significant responses that can be attributed to single stressors, such as chemical exposure. Thus, extrapolation of laboratory results to the wildlife is, in most cases, not appropriate.

A limited number of immune tests can be used in vivo in wild birds. The phytohaemagglutinin (PHA) skin test provides a measure of the proliferative response potential for circulating T lymphocytes to an injected mitogen, the PHA [7]. It has proven easy to adapt to many different bird species both in the laboratory and in the wild, being used in many toxicological, ecological, and even behavioral studies as a measure of cellular-mediated immunity (CMI) during the past decade [4,8,9].

In this study, we used a biomarker approach to assess whether exposure to metal pollution after the Aznalcóllar toxic spill was affecting the immune system of nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) in and around the Doñana National Park (southwestern Spain). We specifically examined the relationship between CMI and Pb, Zn, As, Cu, and Cd concentrations in blood of nestlings of both species monitored for a four-year period (1999, 2001–2003) in the case of white storks and in 1999 in black kites.

White storks and black kites are at the top of the local food web and are common over a wide geographical range [10]; thus, they are convenient species to study the effects of xenobiotics [11]. Some studies have shown kites to be susceptible to metal toxicity [12], and contamination has been suspected as an important factor contributing to the decline of their populations. We focused on nestlings because they represent a vulnerable state of the avian life cycle, the developing immune system is particularly sensitive to contaminants, and a large number of individuals can be easily manipulated under field conditions. Although adults of both species migrate long distances [10], the prefledgling young are fed entirely on food resources obtained locally. Thus, they become good indicators of the availability of the pollutants in the environment. In addition, nestlings of white stork

born in the area in the years subsequent to the spill were detected to have deformed legs and bills [13]. This fact, together with the high genotoxic damage measured in both species since the disaster [14], makes them suitable as sentinels to evaluate the effects of the mine accident.

METHODS

Bird species and study area

The white stork is a large, long-lived, wading bird that breeds from North Africa to northern Europe. The altricial chicks hatch after 33 to 34 d of incubation and depend on adults for both food and shelter. Fledglings leave the nest at 60 to 90 d of age [10]. Our study was conducted in Dehesa de Abajo colony, situated in Puebla del Río, Sevilla, southwestern Spain (37°13'N, 6°09'W; Fig. 1), where white storks breed in open nests at the top of wild olive trees. Today, approximately 300 pairs of white storks breed at Dehesa de Abajo [14], it is one of the largest colonies for the species in the western Palearctic. The mine tailing wastes spilled in 1998 were as close as only 1 km from Dehesa de Abajo, and adults were observed feeding in contaminated zones after the accident.

The black kite is a migratory, long-lived, medium-sized raptor, widely distributed throughout the Palearctic, Ethiopic, and Australasian regions. It is a semialtricial species, with an incubation period of 30 to 32 d. The nestling period comprised 35 to 42 d, and total postfledgling period of dependence is usually 30 to 35 d [10]. This study was conducted in the Doñana National Park and surrounding lands (southwestern Spain, 36°48'–37°20'N, 6°12'–6°40'W; Fig. 1). In this area, black kites are present from early March to August and nest in trees, normally cork oaks, pines, and eucalyptus, located in the border of marshy areas. More than 600 breeding pairs have been recorded in the area for the period of study,

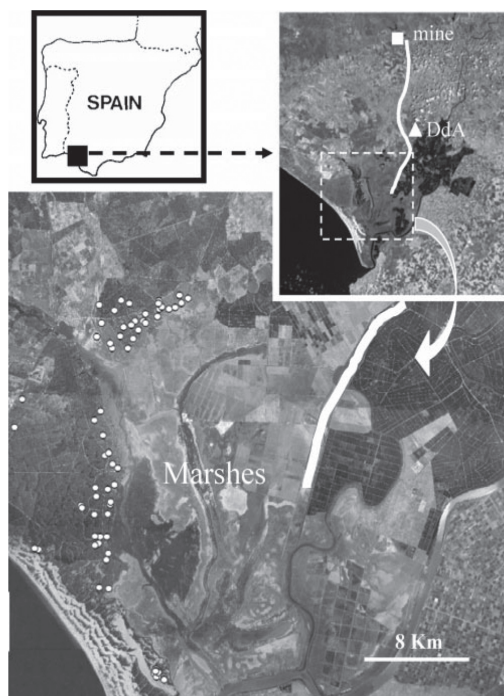


Fig. 1. Geographical location of the study area (Doñana marshes and surrounding lands). The Aznalcóllar mine and the area flooded with the toxic wastes in 1998 are drawn in white color. The location of Dehesa de Abajo stork colony (triangle) and the position of the black kite nests monitored in 1999 (circles) are also indicated.

with a non-breeding population that in certain years has been estimated around 400 to 500 birds. The area affected by the toxic spill is within the foraging grounds of the species.

Cellular-mediated immunity and field procedures

A total of 281 nestling white storks and 89 black kites close to the age of fledging (median age = 52 d old for white storks, following Negro et al. [15], and 32 d old for black kites according to Viñuela and Bustamante [16]), were sampled for both CMI, heavy metals, and As determination.

Cellular-mediated immunity was assessed using the PHA skin test [7]. We injected subcutaneously 0.1 and 0.05 ml of 2 mg/ml PHA-P (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) in phosphate-buffered saline (PBS) in a marked site of the left foot

interdigital web of white storks and of the left midpatagium of black kites, respectively. We measured in triplicate the thickness of the injection site with a digital micrometer (0.001 mm) before and 24 h after injection. Immune response was calculated as the difference between the means of the second minus the first measure [17].

All birds were individually identified with metal and plastic bands before testing. A body condition index was calculated as the residuals from a Model II regression between the \log_{10} of body mass and the \log_{10} of the wing chord length [18]. The minimum, but not the mean, body mass of the two measures was used to reduce the confounding effects of undigested meals on the body mass of nestlings [9].

After measuring the CMI, up to 2 ml of blood were extracted from the brachial vein of nestlings, transferred to lithium-heparinized vials, and frozen at -80°C until analysis for Pb, Zn, As, Cu, and Cd.

Analysis of heavy metals and arsenic

Analyses of Pb, Zn, As, Cu, and Cd were carried out in two different laboratories. The Institute of Agrochemistry and Food Technology (laboratory A, Valencia, Spain) analyzed blood samples of nestling white storks collected in 1999 and 2001. White stork blood samples for 2002 and 2003 and black kite samples collected in 1999 were analyzed at the Institute of Organic Chemistry (laboratory B, Madrid, Spain). A 30min ultrasonic extraction with Triton X-100 (Merck Pharma y Química, Valencia, Spain) [19] was carried out by laboratory A for sample preparation, while laboratory B used an acid digestion as described elsewhere [20].

Analyses of Zn were performed using a flame atomic absorption spectrometer (Spectra A-100, Varian Ibérica, Madrid, Spain). Lead, As, Cu, and Cd were measured using a Perkin-Elmer longitudinal AC Zeeman (AAn-

alyst 600) atomic absorption spectrometer equipped with a transversely heated graphite atomizer (Perkin-Elmer Hispania, Madrid, Spain), and Perkin-Elmer pyrolytic graphite coated tubes with inserted Lvov platform were used. Calibration was performed following the method of additions standard curve.

The detection limits of the methodology were Pb (2 µg/L), Zn (0.23 mg/L), As (24 µg/L), Cu (13 µg/L), and Cd (0.10 µg/L) for laboratory A and Pb (1.7 µg/L), Zn (0.3 mg/L), As (5 µg/L), Cu (3 µg/L), and Cd (0.25 µg/L) for laboratory B. The precision as measured by triplicate analysis, expressed as the relative standard deviation, was always below 10%. The range of recovery evaluated by certified materials and by spiking blood samples with each of the elements was 85 to 115%.

Accuracy was established by analyzing various certified reference samples: a bovine blood (CRM-195) from the Institute for Reference Materials and Measurements (Geel, Belgium); a whole-blood Seronorm®, Trace Element, Whole Blood 2 from Sero AS (Asker, Norway); a CRM sample or TORT-2 (lobster hepatopancreas) from National Research Council of Canada (Ottawa, ON); and an A-13 reference sample of animal blood obtained from the International Atomic Energy Agency (Vienna, Austria). The values obtained for these elements were consistent with the certified values.

We assigned a value of one-half the limit of detection to samples in which metals were below the detection limit.

Statistical analysis

Blood Pb concentrations determined by two atomic absorption spectrophotometry methods similar to those that have been used here by laboratory A and laboratory B (NH₄H₂PO₄ Triton X-100 and nitric acid digestion, respectively) are known to be comparable and provide accurate and precise results when used under optimized experimental conditions [21].

However, other studies have reported consistent differences in Pb determination carried out by different laboratories when applying the same methodologies [22]. Therefore, and trying to avoid potential biases associated with an interlaboratory variation, a calibration study was performed on 125 blood samples of different bird species, representing the range of heavy metals and As concentrations found in Doñana area during monitoring. For each specimen, between 3 and 5 ml of blood were collected in two separated lithium-heparinized vials and frozen at -80°C. Samples of the same individuals were sent to both laboratories and analyzed following the methods described earlier.

We used *r* intraclass correlation coefficient to estimate the fraction of the total variance in heavy metals and As concentrations attributable to the laboratory, that is, its repeatability. This coefficient was calculated as the division between the variance of heavy metals and As concentrations between laboratories, and the total variance in heavy metals and As concentrations in the samples ($n = 14-125$, depending on the element) using the “variance components” tool in SPSS® 10.0 (Chicago, IL, USA). Significance of *r* coefficients was calculated with a one-way analysis of variance [23]. Measurement repeatability was high and significant for Pb ($r = 0.95$, $F_{1,97} = 37.60$, $p < 0.001$), low but significant for Zn and Cu ($r = 0.31$, $F_{1,124} = 1.92$, $p < 0.001$; $r = 0.30$, $F_{1,121} = 1.85$, $p < 0.001$, respectively), and low and nonsignificant for As and Cd ($r = 0.25$, $F_{1,13} = 1.67$, $p = 0.176$; $r = 0.00$, respectively). These results prevented comparisons of average Zn, As, Cu, and Cd concentrations along the four-year study period. However, the high repeatability of Pb between laboratories allowed us to derive an adjustment factor for this metal through regression analysis. We regressed blood Pb concentrations from samples analyzed in laboratory A on samples of the same individuals analyzed in laboratory B using the

“lineal regression” tool (unstandardized residuals, Kolmogorov–Smirnov value = 0.06, degrees of freedom [*df*] = 98, *p* = 0.20) in SPSS 10.0. The resulting regression equation was laboratory A analyzed_[blood Pb] = (1.288 × laboratory B analyzed_[blood Pb]) – 21.911, fitting very well to the data ($r^2 = 0.97$, $F_{1,96} = 2906.96$, *p* < 0.001). By modifying this equation to

$$\text{laboratory A}_{[\text{blood Pb adjusted to laboratory B}]} = \frac{\text{laboratory A}_{[\text{blood Pb at laboratory A}]} + 21.911}{1.288}$$

blood Pb concentrations in 1999 and 2001 were then adjusted to values that we predicted would have resulted if they had been analyzed at laboratory B.

Isotonic regression was used to study the variation of residue levels along the four-year monitoring in nestling white storks. Since only Pb resulted repeatable between laboratories and, therefore, comparable across years, this test was only performed on Pb once it was adjusted through lineal regression as specified previously. Isotonic regression is useful when evaluating hypotheses that specify the complete or partially ordering of means [24]. We expected blood Pb concentration to follow the pattern 1999 ≥ 2001 ≥ 2002 ≥ 2003, with at least one inequality retained (Pb levels decreasing with the time elapsed since the toxic spill).

General linear mixed models were used to assess the relationship between CMI and heavy metals and As concentrations through the Mixed Procedure 8.0 for SAS® (Cary, NC, USA). Generalized linear mixed models simultaneously account for random effects, fixed effects, and covariates [25]. In a study carried out with a larger CMI data set, the authors showed that within years but not among years, nest of rearing had an effect on nestling white storks' CMI [18]. We thus considered siblings as nonindependent analysis units and used nest identity as a random

factor to avoid pseudoreplication. Concentrations of metals were log-transformed where necessary before analyses, and included into the models as covariates.

Body condition has been shown to be correlated with CMI in previous observational and experimental studies ([26] and references therein) as well as being related to the exposure to metals [27]. Therefore, we also included the interactions between body condition and heavy metals and As concentrations as independent variables.

The models were constructed by a stepwise forward procedure, testing the significance of each variable and adding only the variable that resulted in a better fit to the model. The significance of the remaining variables was tested again until no additional variable or interaction reached significance. The result is the most adequate model for explaining the variability in the response variable, where only the significant explanatory variables are retained [9].

The relationships between nestling white storks' CMI in Dehesa de Abajo and life history traits have been demonstrated to change among years [18]. This fact, together with the low interlaboratory consistency (see above), led us to test associations between CMI and heavy metals and As levels separately for each year of monitoring. To minimize the probability of type I error, we considered an effect to be significant when the rejection probability was less than 1%. Because all the white stork samples analyzed in 2001 had Cd concentrations lower than the limit of detection, this metal was not tested in the model performed for 2001. All tests were two tailed.

RESULTS

Heavy metals and arsenic levels

We determined Pb, Zn, As, Cu, and Cd concentrations in 68, 62, 93, and 58 nestling

Table 1. Mean, standard deviation, and range in parentheses ($\mu\text{g/L}$ or mg/L wet wt) of trace elements determined in the blood of nestling white storks and black kites according to year at Doñana area (southwestern Spain) after the Aznalcóllar toxic spill.

Species	Year	Cu ($\mu\text{g/L}$)	Pb ($\mu\text{g/L}$)	Zn (mg/L)	Cd ($\mu\text{g/L}$)	As ($\mu\text{g/L}$)
White stork	1999	425.67 \pm 82.79 (279–776)	79.29 \pm 37.39 (24–157.54)	3.3 \pm 0.96 (1.24–5.25)	0.31 \pm 0.69 (ND–5.1) ^b	28.38 \pm 22.64 (ND–104)
	2001	358.29 \pm 75.12 (224–622)	76.45 \pm 37.96 (21.67–195.58)	1.84 \pm 0.33 (1.24–2.67)		21.06 \pm 18.39 (ND–77)
	2002	373.49 \pm 80.51 (253–682)	72.23 \pm 44.45 (18.56–220.5)	3.18 \pm 0.36 (2.13–4.25)	0.76 \pm 1.08 (ND–9.85)	20.91 \pm 12.72 (ND–80)
	2003	319.74 \pm 88.34 (180–570)	52.28 \pm 34.94 (4.52–195.7)	3.29 \pm 0.37 (2.66–4.5)	0.75 \pm 0.52 (ND–3.25)	18.03 \pm 7.42 (6–36)
Black kite	1999	364.22 \pm 59.2 (252–495)	46.76 \pm 37.6 (ND–265.2)	4.82 \pm 0.94 (3.34–9.58)	0.52 \pm 0.42 (ND–1.9)	124.48 \pm 260.05 (9–1559)
	(n = 89)					

^a n = 34 for Zn.

^b ND = values below the limit of detection.

white storks from 52, 51, 44, and 28 nests sampled in 1999, 2001, 2002, and 2003, respectively. Eighty-nine nestling black kites from 72 nests were sampled in 1999 for metal residue analysis (Table 1).

The result of the isotonic regression in white storks showed that average levels of Pb decreased since the spill ($\bar{E}_4^2 = 0.09$, $p < 0.001$).

Relationships between CMI, heavy metals, and arsenic

Of the five elements studied, only Cu showed a negative significant relationship with CMI in nestling white storks but only in 2002 ($F_{1,40} = 9.66$, $p = 0.004$; Fig. 2). The remaining heavy metals and As, as well as interactions between the elements studied and body condition, did not have a significant effect on CMI in any of the per-year models performed for white storks (all $p > 0.015$) or for black kites in 1999 (all $p > 0.247$). Actually, the relationship between certain elements (e.g., Cd, As) and CMI showed a different trend depending on the year of study and the species (Fig. 2).

DISCUSSION

Heavy metals and arsenic levels

Overall, average heavy metals and As concentrations reported here for nestling white storks and black kites were relatively low when compared to birds in metal-polluted areas [28–30].

An extensive monitoring of heavy metals and As levels in blood of nestling white storks around Spain shows that birds from DdA have residue concentrations similar to conspecific nestlings from other natural areas but much lower than white storks sampled near potential sources of metals, such as refuse dumps or municipal solid-waste incinerator plants (B. Jiménez et al., unpublished data). Blanco et al. [12] reported similar average levels of essential metals (Cu, Zn) in black kites exposed to the emissions of a solid-waste incinerator in Madrid, central Spain. Toxic metals, Pb and Cd, were lower in Doñana compared to Madrid nestlings. In contrast, average As levels was much higher in our study than the average of this metalloid reported in Blanco et al. [12]. Although the Aznalcóllar mine spill cannot be completely discounted to contribute to the high values of As found in Doñana black kites, the foraging habits of the species [31] and the examination of prey remains in and above the nests suggest a seafood origin for this metalloid. The proportion of nestlings with As levels above the reference value was higher among nests where marine fishes were found (75%, $n = 9$) relative to nests without this type of prey remains (40%, $n = 24$, $\chi^2 = 4.93$, $df = 1$, $p = 0.026$). Speciation studies have reported that nearly all the As in the tissues of marine animals is in the form of arsenobetaine [11]. Fortunately, this compound has a low toxicity to vertebrates and is readily excreted. However, the high levels reported suggest further

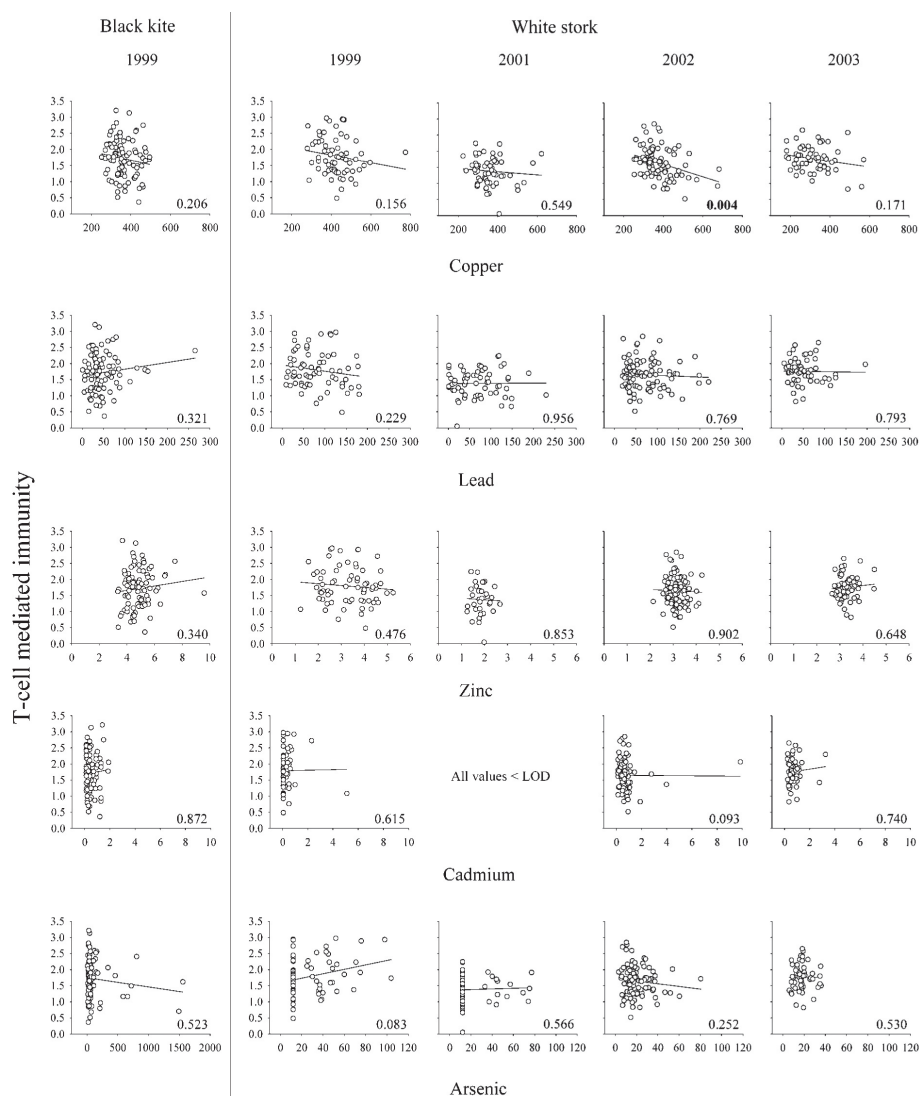


Fig. 2. Relationships between T-cell-mediated immunity, heavy metals (Pb, Zn, Cu, and Cd) and As values in nestling white storks and black kites at Doñana area after the Aznalcólar toxic spill. *p* values of generalized linear mixed models are indicated, with significant results in bold. Lead, Cu, Cd, and As are expressed in $\mu\text{g/L}$ wet weight. Zinc is expressed in mg/L wet weight. Cadmium values were below the limit of detection (LOD) in nestling white storks sampled in 2001.

investigation into possible sources as well as biological effects of this metalloid in Doñana black kite population.

Only one nestling white stork (0.4%) and one black kite (1.1%) showed blood Pb concentration above the value reported to cause sublethal effects in birds (200 $\mu\text{g/L}$ wet wt [32]), with the remaining individuals having background Pb levels. Furthermore, average Pb levels decreased in nestling white storks with the time elapsed since the spill.

Relationships between CMI, heavy metals, and arsenic

As far as we are aware, this is the first study assessing direct relationships between CMI, blood heavy metals, and As levels in nestlings for a four-year period and two bird species in a wild scenario. Although other studies have investigated the effects of metals on nestlings' immune response [33], actual metals concentrations, needed to verify the process, were not determined. On the other hand, and de-

spite the importance of interannual consistency when inferring causality from contaminant exposure data [34], few studies, if any, have been performed for more than one or two years to test the potential effects of pollutants on avian immunity. Here we show how the association between CMI, heavy metals, and As could vary among years. Similarly, Wayland et al. [4] reported inconsistency in the results of relationships between Se concentrations in the liver of adult female common eiders (*Somateria mollissima*) and CMI in two different breeding seasons. In a study parallel to ours, Jovani et al. [18] found variable interannual relationships between CMI and several individual traits in nestling white storks. Cellular-mediated immunity seems to be constrained by short-term fluctuations in energy-demanding functions and the availability of resources [35], implying that different annual environmental conditions affecting CMI [36] or even subtle differences in the timing of adverse episodes within breeding seasons [8] could be affecting the relationship between CMI and life history traits. Similarly, the effects of contaminants in general and metals in particular on CMI are most likely affected by environmental factors that could change from one year to the next. Thus, interannual differences in aspects such as the rate or timing of exposure to metals and antigenic stimulation or diet composition, among others, may influence the relationship between CMI and metals exposure ([6] and references therein).

Here we found a negative association between Cu and CMI, although this relationship was only significant in one of the years of study for nestling white storks. As an essential element, Cu is present in all living organisms, playing an important role in many physiological functions, including the immune response [37], but it can be toxic as well [38]. Some studies have shown that Cu deficiency decreases the immune response [39]. Excess of Cu has also been demonstrated to affect

the immune system of mammals [40]; however, similar results have not been reported previously for birds.

We found no evidence that exposure of nestlings to Pb, Zn, Cd, and As at the levels reported in this study affects their CMI in any of the years of monitoring. Several possible explanations exist for the failure to detect a significant relationship between these elements and CMI. First, the PHA skin test could be too insensitive to demonstrate immunomodulation by heavy metals and As exposure. However, previous studies have demonstrated this test to be effective on birds exposed to metals ([6] and references therein). On the other hand, the immunomodulation action of heavy metals may be dose dependent, with significant relationships occurring only at higher levels [33]. An experimental study with captive red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*) showed that the effects of Pb exposure on the in vitro stimulation of T-lymphocytes by the mitogens PHA and Concanavalin A were dependent not only on the amount of Pb administered but also on the length of the metal exposure [41]. Thus, a third possible explanation was that trace elements may noticeably alter the immune function only after long-term exposure. Synergistic or antagonistic actions between the constituents of the spill or with other contaminants (e.g., pesticides) related to the agricultural activity in the area [2,13] may also account for changes in metal immunological modifying capacity [42]. Finally, individual variability in susceptibility to heavy metals and As may also partially account for the lack of significance in the models. Extensive evidence exists that high exposure to metals results in the development of metal resistance [43]. Aznalcóllar, located at the eastern end of the Iberian Pyrite Belt, has a long history of mining, dating to the pre-Roman period. Earlier studies have shown that metal contamination was present in Doñana birds before the spill [20], although levels reported were not

of concern. This chronic exposure to metals would perhaps have led to organisms to enhance physiological/biochemical mechanisms (e.g., increased enzyme activities, production of metal-binding proteins such as metallothioneins) to counteract the potential effects of the metal contamination. However, studies in this regard have not been carried out to date.

In our study, comparisons of blood heavy metals and As levels with those reported for birds known to be exposed to high metal pollution revealed that, overall, levels of Pb, Zn, As, Cu, and Cd in blood of nestling white storks and black kites are low. At the environmental concentrations reported here, only Cu showed a negative relationship with CMI during monitoring. Up to now, no studies have discussed the effects of Cu on the immune response of wild birds, but it warrants further investigation. Given the complexity of the immune system, its pivotal role in defending animals against attack by pathogens and parasites, and its relationships with the contaminants in general and metals in particular, a future research priority may be to

monitor other aspects of the structural and functional immune system (e.g., humoral immune response). Thus, we could have a clearer picture of the actual effects of these pollutants on immunity since different aspects of the immune system may vary differentially affected by stressors.

From this study, we also have shown how important temporal variability could be on the assessment of the relationship between immune response (CMI) and metals exposure. Interannual consistency is essential when inferring causality from contaminant exposure data [34]. However, it requires long-term studies, which can be labor intensive, expensive, and, in some cases, logistically very difficult. In spite of these limitations, the wide range of stressors that animal populations might experience in the wild support long-term studies as the most appropriate strategy to assess the health status of wildlife. Continued research in this direction may lead us to a better understanding of the mechanisms behind the impairment of health in wild populations and therefore are strongly encouraged.

REFERENCES

1. Grimalt JO, Ferrer M, Macpherson E. 1999. The mine tailing accident in Aznalcóllar. *Sci Total Environ* 242: 3–11.
2. Bonilla-Valverde D, Ruiz-Laguna J, Muñoz A, Ballesteros J, Lorenzo F, Gómez-Ariza JL, López-Barea J. 2004. Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers. *Toxicology* 197: 123–38.
3. Depledge MH. 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In Fossi MC, Leonzio C, eds, *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 261–285.
4. Wayland M, Smits JEG, Gilchrist HG, Marchant T, Keating J. 2003. Biomarker responses in nesting common eiders in the Canadian Arctic in relation to tissue cadmium, mercury, and selenium concentrations. *Ecotoxicology* 12: 225–237.
5. Smits JEG, Blakley BR, Wobeser GA. 1996. Immunotoxicity studies in mink (*Mustela vison*) chronically exposed to dietary bleached kraft pulp mill effluent. *J Wildl Dis* 32: 199–208.
6. Fairbrother A, Smits JE, Grasman K. 2004. Avian immunotoxicology. *J Toxicol Environ Health* 7: 105–137.
7. Goto N, Kodama H, Okada K, Fujimoto Y. 1978. Suppression of phytohemagglutinin skin response in thymectomized chickens. *Poult Sci* 57: 246–250.
8. Christe P, De Lope F, González G, Saino N, Møller AP. 2001. The influence of environmental conditions on immune responses, morphology and recapture probability of nestling house martins (*Delichon urbica*). *Oecologia* 126: 333–338.
9. Tella JL, Forero MG, Bertellotti M, Donázar JA, Blanco G, Ceballos O. 2001. Offspring body condition and immunocompetence are negatively affected by high breeding densities in a colonial seabird: A multiscale approach. *Proc R Soc Lond B* 268: 1455–1461.
10. Cramp S, Simmons KEL. 1980. *The Birds of the Western Palearctic*. Oxford University Press, Oxford, UK.
11. Peakall D, Burger J. 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: Speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicol Environ Saf* 56: 110–121.
12. Blanco G, Frías O, Jiménez B, Gómez G. 2003. Factors influencing variability and potential uptake routes of heavy metals in black kites exposed to emissions from a solid-waste incinerator. *Environ Toxicol Chem* 22: 2711–2718.
13. Smits JEG, Bortolotti GR, Baos R, Blas J, Hiraldo F, Xie Q. 2005. Skeletal pathology in white storks (*Ciconia ciconia*) associated with heavy metal contamination in southwestern Spain. *Toxicol Pathol* 33: 441–448.
14. Pastor N, Baos R, López-Lázaro M, Jovani R, Tella JL, Hajji N, Hiraldo F, Cortés F. 2004. A 4-year follow-up analysis of genotoxic damage in birds of the Doñana area (SW Spain) in the wake of the 1998 mining waste spill. *Mutagenesis* 19: 61–65.
15. Negro JJ, Tella JL, Blanco G, Forero MG, Garrido-Fernández J. 2000. Diet explains interpopulation variation of plasma carotenoids and skin pigmentation in nestling white storks. *Physiol Biochem Zool* 73: 97–101.
16. Viñuela J, Bustamante J. 1992. Effect of growth and hatching asynchrony on the fledging age of black and red kite. *Auk* 109: 748–757.
17. Smits JE, Bortolotti GR, Tella JL. 1999. Simplifying the phytohemagglutinin skin testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct Ecol* 13: 567–572.
18. Jovani R, Tella JL, Blanco G, Bertellotti M. 2004. Variable interannual relationships between T-cell mediated immunity and individual traits in white storks. *Ardeola* 51: 357–364.
19. Benito V, Devesa V, Muñoz O, Suñer MA, Montoro R, Baos R, Hiraldo F, Ferrer M, Fernández M, González MJ. 1999. Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine. *Sci Total Environ* 242: 309–323.
20. Hernández LM, Gómara G, Fernández M, Jiménez B, González MJ, Baos R, Hiraldo F, Ferrer M, Benito V, Suñer MA, Devesa V, Muñoz O, Montoro R. 1999. Accumulation of heavy metals and As in wetland birds in the area around Doñana National Park affected by the Aznalcóllar toxic spill. *Sci Total Environ* 242: 293–308.
21. Subramanian KS. 1987. Determination of lead in blood: Comparison of two GFAAS methods. *At Spectrosc* 8: 7–11.

22. Miller MJR, Restani M, Harmata AR, Bortolotti GR, Wayland ME. 1998. A comparison of blood lead levels in bald eagles from two regions on the Great Plains of North America. *J Wildl Dis* 34: 704–714.
23. Lessells C, Boag PT. 1987. Unrepeatable repeatabilities: A common mistake. *Auk* 104: 116–121.
24. Gaines SD, Rice WR. 1990. Analysis of biological data when there are ordered expectations. *Am Nat* 135: 310–317.
25. Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD. 1996. *SAS System for Mixed Models*. SAS Institute, Cary, NC, USA.
26. Alonso-Álvarez C, Tella JL. 2001. Effects of experimental food restriction and body-mass change on the avian T-cell-mediated immune response. *Can J Zool* 79: 101–105.
27. Debacker V, Jauniaux T, Coignoul F, Bouqueneau JM. 2000. Heavy metals contamination and body condition of wintering guillemots (*Uria aalge*) at the Belgian coast from 1993 to 1998. *Environ Res* 84: 310–17.
28. Burger J, Gochfeld M. 1997. Age differences in metals in the blood of herring (*Larus argentatus*) and Franklin's (*Larus pipixcan*) gulls. *Arch Environ Contam Toxicol* 33: 436–440.
29. Falandysz J, Jakuczun B, Mizera T. 1988. Metals and organochlorines in four female white-tailed eagles. *Mar Pollut Bull* 19: 521–526.
30. Van Eeden PH, Schoonbee HJ. 1996. Metal concentration in liver, kidney, bone, and blood of three species of birds from a metal-polluted wetland. *Water S A (Pretoria)* 22: 351–358.
31. Espina J. 1982. Variaciones alimenticias en una población de milanos negros (*Milvus migrans*). Master's thesis. Universidad Complutense, Madrid, Spain.
32. Franson J. 1996. Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl. In Beyer NW, Heinz GH, Redmon-Norwood AW, eds, *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 265–279.
33. Fair JM, Myers OB. 2002. The ecological and physiological costs of lead shot and immunological challenge to developing western bluebirds. *Ecotoxicology* 11: 199–208.
34. Fox GA. 1991. Practical causal inference for eco-epidemiologists. *J Toxicol Environ Health* 33: 359–373.
35. Lifjeld JT, Dunn PO, Whittingham LA. 2002. Short-term fluctuations in cellular immunity of tree swallows feeding nestlings. *Oecologia* 130: 185–190.
36. Møller AP. 2002. North Atlantic Oscillation (NAO) effects of climate on the relative importance of first and second clutches in a migratory passerine bird. *J Anim Ecol* 71: 201–210.
37. Beisel WR. 1982. Single nutrients in immunity. *Am J Clin Nutr* 35: 417–468.
38. Mason KE. 1979. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. *J Nutr* 109: 1979–2066.
39. Jones DG. 1984. Effects of dietary copper depletion on acute and delayed inflammatory response in mice. *Res Vet Sci* 37: 205–210.
40. Pocino M, Baute L, Malavé I. 1991. Influence of the oral administration of excess copper on the immune response. *Fundam Appl Toxicol* 16: 249–256.
41. Redig PT, Lawler EM, Schwartz S, Dunnette JL, Stephenson B, Duke GE. 1991. Effects of chronic exposure to sublethal concentrations of lead acetate on heme synthesis and immune function in red-tailed hawks. *Arch Environ Contam Toxicol* 21: 72–77.
42. Institoris L, Siroki O, Undeger U. 1999. Immunological examinations of repeated dose combined exposure by dimethoate and two heavy metals in rats. *Human and Experimental Toxicology* 18: 88–94.
43. Lopes I, Baird DJ, Ribeiro R. 2004. Genetic determination of tolerance to lethal and sublethal copper concentrations in field populations of *Daphnia longispina*. *Arch Environ Contam Toxicol* 46: 43–51.

Acknowledgments

The authors are indebted to many people who help with the field work, especially to J.M. Grande, J.M. Terrero, M. García, M.C. Quintero, R. Rodríguez, F.J. Hernández, G. García, F.G. Vilches, M. Guerrero, J. Blas, H. Lefranc, A. Sánchez, M.C. Medina, N. Pastor, S. Cabezas, M. Ardila, and Equipo de Seguimiento de la Estación Biológica de Doñana. We also thank C. Tabera and V. Benito for analyzing metals and C.M. Herrera for statistical advice.

R. Díaz-Delgado (LAST-EBD) and F. Sergio helped with Figure 1. J.E.G. Smits improved early drafts of this manuscript. Funds were provided by project B-00857 of Ministerio de Ciencia y Tecnología y Fondos Feder, Telefónica Móviles S.A., and Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. R. Baos received financial support from the Spanish Ministerio de Educación y Cultura through a FPU fellowship. The Empresa de Gestión Medioambiental, SA, EGMASA, and the European Community in a I3P grant also provided support.

CAPÍTULO 2



Evaluation of Genotoxic Effects of Heavy Metals and Arsenic in Wild Nestling White Storks (*Ciconia ciconia*) and Black Kites (*Milvus migrans*) from Southwestern Spain after a Mining Accident

Raquel Baos¹, Roger Jovani¹, Nuria Pastor², José L. Tella¹, Begoña Jiménez³, Gemma Gómez³, María J. González³, and Fernando Hiraldo¹

¹ Department of Applied Biology, Estación Biológica de Doñana (C.S.I.C.), Avda. M^a Luisa s/n Pabellón del Perú, 41013 Sevilla, Spain

² Department of Cellular Biology, University of Seville, Avda. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla, Spain

³ Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry (C.S.I.C.), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

ABSTRACT

Studies of birds from Doñana (southwestern Spain) after the Aznalcóllar mining accident (April 1998) have reported high levels of genetic damage when compared to conspecifics from reference areas. However, potential relationships between DNA damage and metal pollution have not yet been reported. The aim of the present study was to investigate the current levels of Zn, Pb, As, Cu, and Cd and to determine if they were associated with the genetic damage observed in free-living, nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) born in the Doñana area after the mining spill. Blood concentrations of heavy metals and of As were quantified and DNA damage (comet assay) was determined in 258 storks and 132 kites monitored during a four-year period (1999–2002). Correlations between these elements and genetic damage varied between species and throughout years within species. Some elements did not show any relationship with DNA damage (e.g., Pb), whereas others had a significant correlation (e.g., As in storks, and Cu and Cd in kites) or only marginal statistical effects (e.g., Zn and Cd in storks, and As in kites) in some years but not in others. These results suggest that nestling white storks and black kites were affected, in part, by the elements studied, but they alone do not satisfactorily explain the observed DNA damage. Moreover, our results show that species-specific differences should be carefully considered when planning schemes for pollution monitoring, and highlight the need for including the temporal scale into the study of the pollutants effects in the wild.

Key Words: DNA damage Comet assay Heavy metals Birds Aznalcóllar

INTRODUCTION

Mining and smelting activities generally represent a risk to wildlife inhabiting the surrounding areas [1]. Organisms living in these areas are chronically exposed to high levels of metals and related products that may cause detrimental health effects on individuals and populations [2]. In addition, acute contamination episodes resulting from accidental releases of the toxic wastes generated in their facilities add more concern about the impact that these kinds of activities may have on wildlife populations and ecosystems. An example is the accidental spill that happened in the Aznalcóllar mine, Sevilla (southwestern Spain), in April 1998. The tailings dam broke open, releasing more than 6,000,000 m³ of acidic wastes into the Agrio-Guadiamar river system. The toxic spill flooded more than 4,000 ha of riverbanks and adjacent land, threatening an ecologically sensitive area, the Doñana National Park, which is the last refuge for some globally threatened wildlife species and the largest reserve of bird species in Europe [3].

Cleanup operations started a short time after the accident and prevented the toxic sludge from reaching the core of the Doñana National Park [3]. The high amounts of metals spilled and the ecological relevance of the threatened area promoted a long-term monitoring plan to assess the biological effects of this environmental disaster.

Classically, pollution-monitoring approaches have been based on chemical analyses of water, sediment, and tissue samples. During the last decade, however, these approaches have been improved greatly by the addition of measurements on a wide range of biochemical, genetic, physiological, and ecological variables or biomarkers. These measurements, coupled with tissue residue analysis, provide an integrated detection system for evaluating the bioavailability, bioac-

cumulation, and ecotoxicological effects of pollutants on wild organisms [4].

Biomarkers at the molecular or cellular level represent early or initial responses to environmental perturbations and contamination. Among them, DNA damage is an endpoint of increasing relevance in recent years as an important target of environmental stress in both aquatic and terrestrial organisms [5,6]. Genotoxic effects of environmental contaminants may include the initiation of carcinogenicity and the generation of hereditary defects via germ cell mutations and teratogenicity [6]. These have the potential to impact individual organism fitness, reproductive success, and subsequently, population dynamics [7], thus being an issue of major concern for conservation biology.

The monitoring of genotoxicity in the wild requires an adequate selection of representative organisms as sentinels. Avian species, through their trophic relationships, represent ideal indicators for assessing environmental health. Here, we have selected white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) as sentinel species for several reasons. They are at the top of the local food web and are common over a wide geographical range [8], thus being convenient species to study the effects of xenobiotics [9]. Some studies have shown black kites to be susceptible to metal toxicity [10], and contamination has been suspected as an important factor contributing to the decline of their populations [11]. Although adults of both species migrate long distances, the pre fledging young are fed entirely on food resources obtained locally and have been demonstrated recently to be appropriate as sentinels for genotoxic evaluation in the study area [12–14].

The technique used for measuring DNA damage was the single-cell gel electrophoresis or comet assay. It has proven to be extremely sensitive and useful in the area of genetic ecotoxicology and environmental biomonitoring

[15]. The alkaline version of this technique, introduced by Singh et al. [16], allows the evaluation of DNA damage in individual cells, including double- and single-strand breaks, alkali-labile sites, DNA protein cross-links, and incomplete excision repair events. Moreover, the comet assay shows clear dose-response relationships even at relatively low levels of naturally occurring genotoxins [6].

Although the effects of metals on bird species have been studied in terms of their toxicity and bioaccumulation, not much is known about genotoxicity, especially under natural conditions [17]. To our knowledge, no data are available concerning genotoxicity with the comet assay in wild birds other than those previously reported by us [12–14]. In our previous works, we have shown that nestling white storks and black kites from Doñana had higher genotoxic damage than control birds sampled in reference areas [12,13]. Furthermore, the observed damage had increased over a four-year period after the toxic spill [14]. Although a number of factors may have been involved, the genotoxic, mutagenic, and even carcinogenic nature of some of the metals spilled in the Aznalcóllar mine accident [18] led us to consider them as the most likely causative agents. To test this hypothesis, we measured Pb, Zn, As, Cu, and Cd concentrations in blood of nestling white storks and black kites and looked for relationships between these elements and the DNA damage previously reported for both species with the comet assay [14].

To our knowledge, the present study is the first to be performed *in vivo* on wild nestlings to study individual relationships between DNA damage measured with the comet assay and levels of heavy metals and As. Moreover, we have performed it in two bird species along a four-year period to preclude the chances of spurious results caused by temporal, spatial, or ecological variability in the biological response.

MATERIALS AND METHODS

Collection sites and field procedures

Blood sampling fieldwork was conducted in successive years from 1999 to 2002. Nestling white storks were sampled in the Dehesa de Abajo colony (Puebla del Río, Sevilla, southwestern Spain; 37°13'N, 6°09'W), where this species breeds in open nests at the top of wild olive trees. Today, approximately 300 white storks breed at Dehesa de Abajo, making this one of the largest colonies for the species in the western Palearctic. The toxic wastes spilled in 1998 were as close as 1 km from the colony [19]. Samples of nestling black kites were collected in and around the Doñana National Park (southwestern Spain; 36°48'–37°20'N, 6°12'–6°40'W) in the vicinity of the area affected by the spill. In Doñana, black kites are present from early March to August and nest in trees, normally cork oaks, pines, and eucalyptus, located in the border of marshy areas. More than 600 breeding pairs have been recorded in the area during the study period, with a nonbreeding population that in certain years has been estimated as approximately 400 to 500 individuals [19]. The area affected by the toxic spill is within the foraging grounds of our two sampled bird species (Fig. 1).

A total of 258 nestling white storks and 132 black kites close to the age of fledging (white storks: median age, 52 d, calculated according to the method described in Negro et al. [20]; black kites: median age, 34 d, according to Viñuela and Bustamante [21]) were sampled for both comet assay and determination of blood heavy metals and As levels.

All birds were individually identified with metal and plastic bands before sampling. Between 2.5 to 3 ml of blood were collected from the brachial vein of nestlings. Approximately 1 ml was placed in vials with ethylenediaminetetra-acetic acid as an anticoagulant and then transported in coolers to the laboratory on the day of collection. The remaining

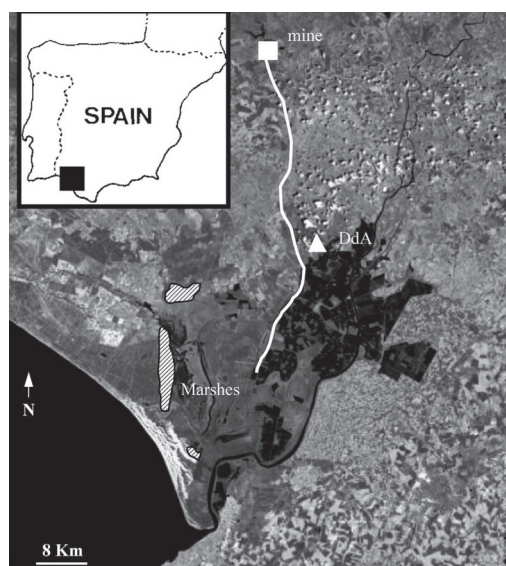


Fig. 1. Map of the Doñana area (southwestern Spain) showing the location of the Aznalcóllar mine and the area affected by the toxic spill in 1998. The figure also illustrates the position of the Dehesa de Abajo (DdA) stork colony as well as the three main breeding areas of the black kite population sampled (striped areas).

blood was transferred to lithium-heparinized vials and frozen at -80°C until analysis for Pb, Zn, As, Cu, and Cd.

Before returning birds to the nest, their wing chord length and body mass were recorded. A body condition index was calculated as the residuals from a Model II regression between the \log_{10} of the body mass and the \log_{10} of the wing chord length [22].

Lymphocyte preparation and comet assay

Isolation of lymphocytes was performed by centrifugation in a density gradient (2,000 rpm, 30 min) using a lymphocyte separation medium (Ficoll-Paque; Seromed, Berlin, Germany). Finally, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), and lymphocyte concentrations were adjusted to approximately 10^5 cells/ml PBS.

For the comet assay, the protocol of Singh et al. [16] was followed, with some modifications to make it suitable for the bird lymphocytes, as reported elsewhere [12–14].

Fifty randomly selected lymphocyte comet images were analyzed from each sampled bird. The slides were examined at $\times 200$ magnification using a $\times 20$ objective on a fluorescence microscope (excitation filter, 550 nm; barrier filter, 590 nm; Vanox AHB3; Olympus, Tokyo, Japan). Measurements were made using CASys image-analysis software (Synoptics, Cambridge, UK), and the parameter chosen was the tail moment ((tail length)·(tail intensity or % migrated DNA)) [23].

Heavy metals and As determination

Analyses of Pb, Zn, As, Cu, and Cd were performed in two different laboratories. The Institute of Agrochemistry and Food Technology (laboratory A; Valencia, Spain) analyzed blood samples of nestling white storks collected from 1999 to 2001. White stork blood samples in 2002 and samples of black kites collected during the whole period of study (1999–2002) were analyzed at the Institute of Organic Chemistry (laboratory B; Madrid, Spain). After digestion of biological samples, the total concentrations of Pb, As, Cu, and Cd were measured by atomic absorption spectrometry as described previously in Baos et al. [19]. Analyses of Zn were performed using a flame atomic absorption spectrometer (Spectra A-100; Varian Ibérica, Madrid, Spain). For laboratory A, the detection limits (DLs) were as follows: Pb, 2 $\mu\text{g/L}$; Zn, 0.23 mg/L; As, 24 $\mu\text{g/L}$; Cu, 13 $\mu\text{g/L}$; and Cd, 0.10 $\mu\text{g/L}$. For laboratory B, the DLs were as follows: Pb, 1.7 $\mu\text{g/L}$; Zn, 0.3 mg/L; As, 5 $\mu\text{g/L}$; Cu, 3 $\mu\text{g/L}$; and Cd, 0.25 $\mu\text{g/L}$. Analytical results under the minimum detectable concentration were set to half the respective DL. The precision as measured by triplicate analysis, expressed as the relative standard deviation, was always less than 10%. The range of recovery evaluated by certified materials and by spiking blood samples with each of the elements was 85 to 115%. Accuracy was established by analyzing various

certified reference samples (for details, see Baos et al. [19]). Values were consistently within the certified ranges for each element (data not shown).

The present study is framed into the biomonitoring program for assessing the effects of the Aznalcóllar toxic spill on Doñana bird populations. In this context, information regarding heavy metals and As levels on nestling white storks and black kites has been reported, in part, elsewhere [19], but temporal trends in concentrations of blood metals have not.

Statistical analysis

We used isotonic regression to test the variation on heavy metals and As concentrations through the period of study. This test is useful when an a priori hypothesis exists about the complete or partial order of the groups [24]. Here, because of the successive cleanup operations, we expected decreasing residue levels through time, although some successive years could show no change. In the case of white storks, variation in levels of As and heavy metals was studied along three years (1999–2001), for which samples were analyzed in laboratory A. Moreover, because Pb concentrations showed a high repeatability between samples of the same individuals analyzed by both laboratories (for further details, see Baos et al. [19]), the analysis of this metal was extended one more year up to 2002.

General linear mixed models (GLMMs) were used to assess the relationship between DNA damage and levels of heavy metals and As through the MIXED Procedure 8.0 for SAS® (Cary, NC, USA). Mixed models simultaneously account for random effects, fixed effects, and covariates [25]. Average tail moment was \log_{10} -transformed when necessary to attain normality. Because genotoxic damage could be influenced by sharing common parents and rearing conditions, we considered siblings to be nonindependent analysis

units and, therefore, included nest identity as a random factor. Concentrations of heavy metals and As were \log_{10} -transformed when necessary before analyses and included in the models as covariates along with the body condition index. Interactions between body condition and levels of heavy metals and As were also tested. Age and sex effects were not studied, because they were demonstrated previously not to affect DNA damage in nestlings of both species [12–14].

In the case of black kites, the reduced number of two- and three-chick broods (see *Results*) prompted us to use the average of nestlings' mean tail moment as the measure of the genotoxic damage in nests where more than one nestling was sampled. Similarly, independent variables were also averaged per nest before testing.

The effect of each independent variable on genotoxic damage was first studied through univariable tests for each year and for each variable separately. Bonferroni correction was not applied, because our aim was to show the extent to which single-year studies could produce significant univariable relationships [22]. In a second analysis, multivariable models were produced in which element concentrations and body condition, as well as its interaction with residue levels, were fitted to the model and controlled for the expected covariance among the explanatory variables. Analyses were performed separately for each year of monitoring. The models were constructed by a stepwise backward procedure in which the least significant terms were sequentially removed [25]. Final (i.e., minimum adequate) models only retained those terms showing a significant effect on DNA damage at a >5% rejection probability.

Because all the samples of white storks analyzed in 2000 and 2001 had Cd concentrations lower than the DL (Table 1), this metal was not tested in the isotonic regression analysis or in the mixed models performed for these years. All tests were two-tailed.

Table 1. Trace elements in blood of nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) at Doñana area (southwestern Spain)^a.

Species	Year	Cu (µg/L)	Pb (µg/L)	Zn (mg/L)	Cd (µg/L)	As (µg/L)
White stork	1999 (n = 64)	424.34 ± 84.3 (279–776)	80.45 ± 37.78 (24–157.54)	3.26 ± 0.96 (1.24–5.25)	0.31 ± 0.71 (ND–5.1)	29.14 ± 22.88 (ND–104)
	2000 (n = 39)	351.69 ± 52.6 (236–503)	48.84 ± 23.02 (ND–97.76)	2.76 ± 0.46 (1.5–3.7)	ND	31.68 ± 48.72 (ND–248)
	2001 (n = 64) ^b	358.86 ± 74.01 (224–622)	70.52 ± 39.72 (ND–195.58)	1.85 ± 0.33 (1.24–2.67)	ND	20.78 ± 18.17 (ND–77)
	2002 (n = 91)	373.27 ± 81.2 (253–682)	73.23 ± 44.40 (18.56–220.5)	3.18 ± 0.37 (2.13–4.25)	0.76 ± 1.09 (ND–9.85)	21.06 ± 12.82 (ND–80.39)
Black kite	1999 (n = 43)	356.42 ± 48.35 (252–471)	45.83 ± 45.73 (4.7–265.2)	5.15 ± 0.91 (3.34–7.47)	0.43 ± 0.45 (ND–1.9)	262.36 ± 469.87 (ND–1,559)
	2000 (n = 31)	368.65 ± 72.78 (236–561)	39.10 ± 50.24 (3.2–293)	5.28 ± 1.02 (2.25–7.51)	0.63 ± 0.50 (ND–1.8)	28.68 ± 56.20 (ND–298.7)
	2001 (n = 36)	357.47 ± 125.19 (200–737)	36.97 ± 19.16 (12.6–84.28)	5.21 ± 0.56 (4–6.6)	1.63 ± 1.44 (0.57–7.13)	15.50 ± 18.43 (ND–97.74)
	2002 (n = 22)	312.91 ± 41.97 (230–381)	27.76 ± 52.85 (ND–235)	4.76 ± 0.60 (2.95–6.09)	0.47 ± 0.23 (ND–0.9)	40.22 ± 47.88 (ND–165.9)

^a Values are presented as the mean ± standard deviation. The range is given in parentheses. Measurements are on a wet-weight basis. ND = not detected.

^b n = 36 for Zn.

RESULTS

Levels of heavy metals and As

We determined Pb, Zn, As, Cu, and Cd concentrations in 64, 39, 64, and 91 nestling white storks from 48, 25, 44, and 52 nests sampled in 1999, 2000, 2001, and 2002, respectively. In the case of black kites, 43, 31, 36, and 22 nestlings from 40, 28, 27, and 17 nests were sampled for the same period of time (Table 1).

The results of the isotonic regression were significant for Pb (white storks: $\bar{E}_4^2 = 0.029$, $p = 0.01$; black kites: $\bar{E}_4^2 = 0.171$, $p < 0.001$), Zn (white storks: $\bar{E}_3^2 = 0.396$, $p < 0.001$; black kites: $\bar{E}_4^2 = 0.041$, $p = 0.033$), Cu (white storks: $\bar{E}_4^2 = 0.176$, $p < 0.001$; black kites: $\bar{E}_4^2 = 0.060$, $p = 0.009$), and As (white storks: $\bar{E}_3^2 = 0.036$, $p = 0.014$; black kites: $\bar{E}_4^2 = 0.243$, $p < 0.001$) in nestlings of both species. Levels of these elements adjusted to the pattern 1999 ≥ 2000 ≥ 2001 in white storks (1999 ≥ 2000 ≥ 2001 ≥ 2002 for Pb) and to 1999 ≥ 2000 ≥ 2001 ≥ 2002 in black kites (Table 1). That was not the case for Cd concentrations in nestling black kites ($\bar{E}_4^2 = 0.008$, $p = 0.335$) (Table 1). In white storks, Cd levels were under the DL in the last two years of the period for which temporal variation could be established (i.e., 1999–2001) (Table 1).

Relationships between DNA damage and levels of heavy metals and As

Univariable analyses gave a puzzling picture of the relationships between DNA damage and levels of heavy metals and As, as well as body condition (Figs. 2 and 3). Lead was not significantly related to DNA damage in either nestling white storks or black kites during the study period (Figs. 2 and 3). Similarly, Zn effects on DNA damage were not significant for nestling black kites in any of the years studied and were only nearly significant for nestling white storks in 1999 (Figs. 2 and 3). Arsenic, Cd, and Cu showed significant relationships with DNA damage in nestling white storks (in the case of As) and in black kites (Cd and Cu) in single and different years of monitoring (Figs. 2 and 3). The effect of body condition on DNA damage was only significant for nestling white storks in 2002 (Figs. 2 and 3).

In the multivariable analyses, final models for nestling white storks in 1999 and 2001 and for black kites in 1999 did not retain any of the variables tested or interactions (Tables 2 and 3). Arsenic and body condition were the only variables retained into the final models performed for nestling white storks in 2000 and 2002, respectively, both showing a negative effect on DNA damage (i.e., the more As,

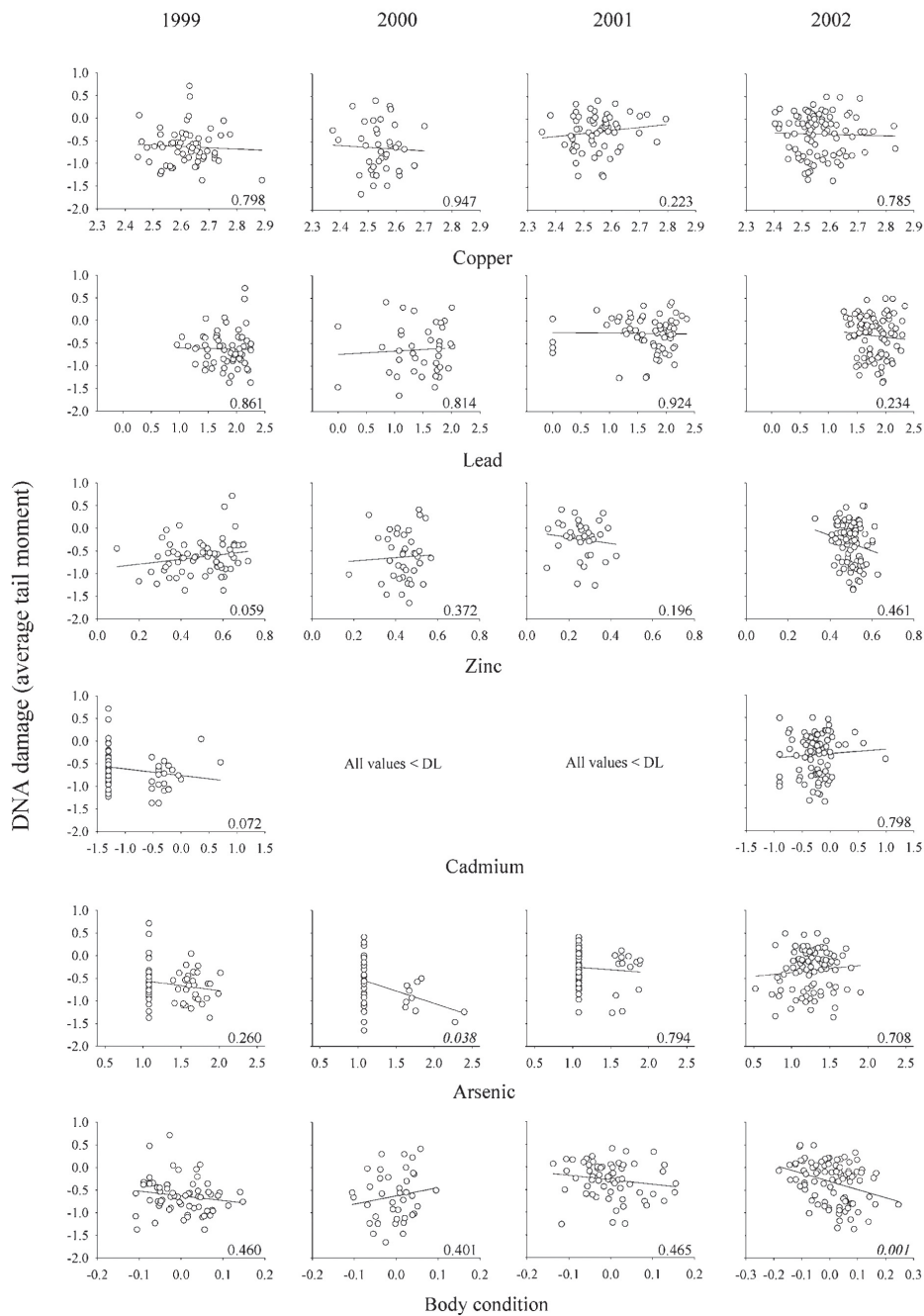


Fig. 2. Relationships between DNA damage (log₁₀ average tail moment), heavy metals (Pb, Zn, Cu, and Cd), and As (log₁₀) in nestling white storks (*Ciconia ciconia*) from Dehesa de Abajo (southwestern Spain) after the Aznalcóllar mining accident. The *p* values of univariable general linear mixed models are indicated, with significant results in *italic*.

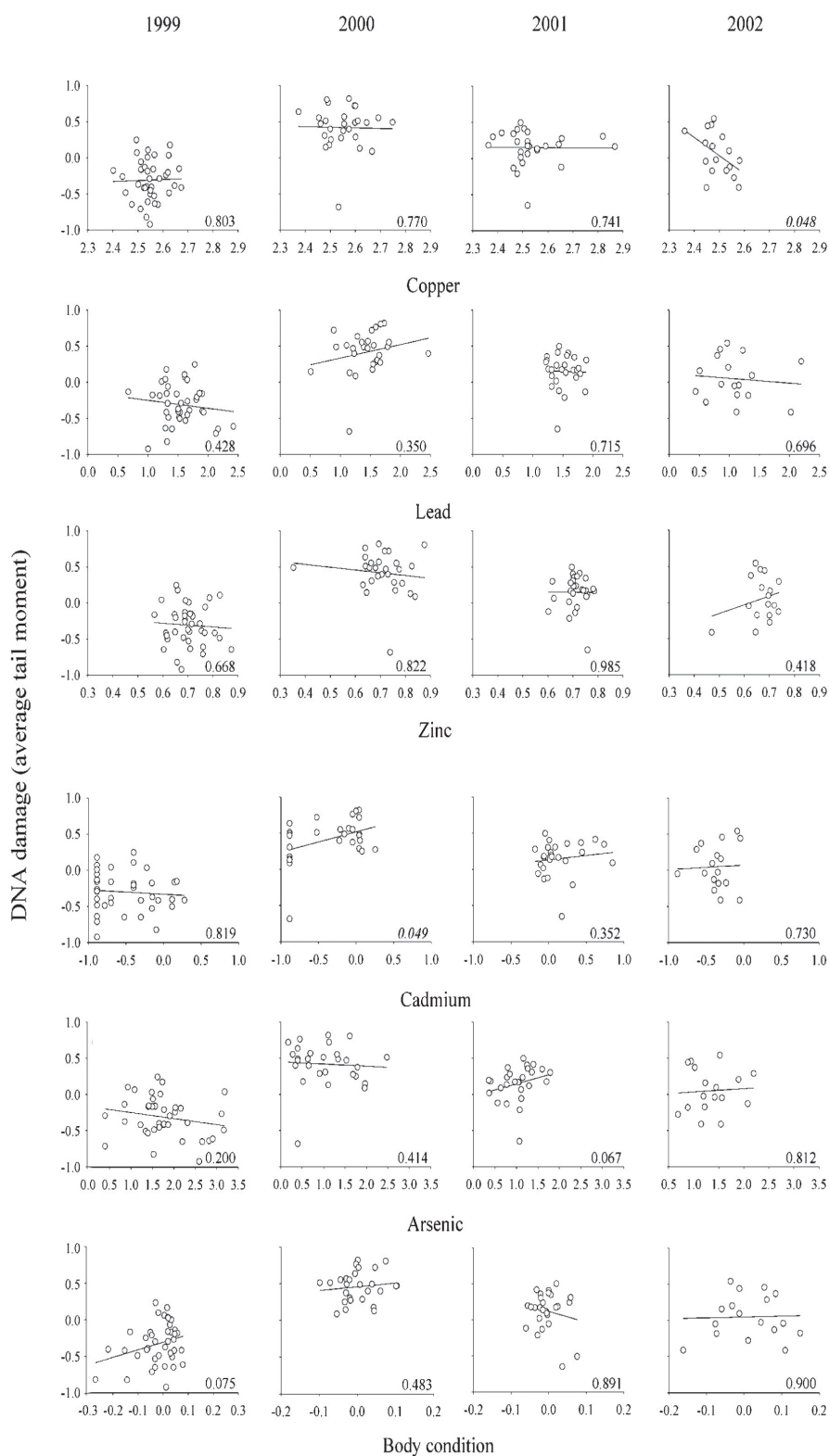


Fig. 3. Relationships between DNA damage (log₁₀ average tail moment), heavy metals (Pb, Zn, Cu, and Cd), and As (log₁₀) in nestling black kites (*Milvus migrans*) from Doñana area (southwestern Spain) after the Aznalcóllar mining accident. The *p* values of univariable general linear mixed models are indicated, with significant results in italic.

Table 2. Summary of results from the multivariable general linear mixed models (GLMMs) explaining DNA damage (average tail moment) in nestling white storks (*Ciconia ciconia*)^a.

Year	Effect	Estimate	Standard error	F (df)	p
1999	All variables				>0.0551
2000	Intercept	0.0457	0.3101	0.15 ^b (24)	0.8841
	As	-0.5493	0.2328	5.56 (1,11)	0.0379
	Rest of variables				>0.2167
2001	All variables				>0.1957
2002	Intercept	-0.2806	0.0543	-5.17 ^b (51)	<0.0001
	Body condition	-2.0474	0.5454	-3.75 (1,38)	0.0006
	Rest of variables				>0.2075

^a The estimated effect and standard error as well as *F* values and associated probabilities are shown for those variables that significantly improved the fit of the model.

^b *t* test.

the less DNA damage, and the better the body condition, the less the DNA damage) (Table 2). Regarding black kites, the final model in 2000 only retained Cd as a significant variable, with a positive effect on DNA damage (i.e., the more Cd, the more DNA damage) (Table 3). Body condition and its interaction with Zn showed significant effects on nestling black kites' DNA damage in 2001 (Table 3), indicating that average tail moment was greater in birds with higher body condition and that decreasing Zn levels have a greater detrimental effect on DNA of nestlings in good condition than on that of nestlings in poor condition. Body condition was also retained in the final model for nestling black kites in 2002, and the direction of the response was the same as that in the previous year (i.e., positive) (Table 3). Copper and the interaction between body condition and Cd were also significant in 2002. High levels of Cd lead to higher DNA damage when body condition is low; that is, increasing Cd levels have a greater detrimental effect on DNA damage of nestlings in poor condition than on that of nestlings in good condition. Copper showed a negative effect on nestlings' DNA damage (i.e., the more Cu, the less DNA damage) (Table 3).

Nest identity had a significant effect on DNA damage in the multivariable models for white storks sampled in 1999 ($Z = 2.27$, $p = 0.012$) and in 2002 ($Z = 3.66$, $p < 0.001$), but not in 2000 ($Z = 0.08$, $p = 0.470$) or in 2001 ($Z = 1.11$, $p = 0.134$).

DISCUSSION

Levels of heavy metals and As

The present results corroborate what was reported in a previous work [19]. Levels of heavy metals and As in the blood of both species' nestlings were, overall, similar to those in conspecifics from other natural areas around Spain and lower than those reported for birds sampled near potential sources of metals, such as refuse dumps or municipal solid-waste incinerator plants [10] (B. Jiménez et al., unpublished data). The exception to the latter was As in black kites, especially during the first year of monitoring (see also Baos et al. [19]). Nonetheless, levels of this metalloid, as well as levels of Pb, Zn, and Cu, showed a tendency to decrease with the time elapsed since the toxic spill in both white storks and black kites. Cadmium did not follow the same pattern in black kites, although levels were lower than those reported for this species by Blanco et al. [10]. Lead levels causing sublethal effects in birds ($>200 \mu\text{g/L}$ [26]) were only reached by 0.4% of the nestling white storks and by 2.3% of black kites sampled throughout the four-year period of monitoring.

Relationships between DNA damage and levels of heavy metals and As

In the present study, we showed how the relationships between DNA damage, heavy metals (Pb, Zn, Cu, and Cd), and As varied

Table 3. Summary of results from the multivariable general linear mixed models (GLMMs) explaining DNA damage (average tail moment) in nestling black kites (*Milvus migrans*)^a.

Year	Effect	Estimate	Standard error	F (df)	p
1999	All variables				>0.2001
2000	Intercept	3.6002	0.3768	9.56 ^b (26)	<0.0001
	Cd	1.4029	0.6792	4.27 (1,26)	0.0490
	Rest of variables				>0.3529
2001	Intercept	4.2233	1.7439	2.42 ^b (22)	0.0241
	Zn	-0.4978	0.3324	2.24 (1,22)	0.1485
	Body condition	104.5200	46.7031	5.01 (1,22)	0.0357
	Zn × body condition	-19.3722	8.9367	4.70 (1,22)	0.0413
	Rest of variables				>0.1142
2002	Intercept	1.3145	0.4327	3.04 ^b (12)	0.0103
	Cu	-0.0044	0.0013	12.02 (1,12)	0.0047
	Cd	0.2547	0.2456	1.06 (1,12)	0.3201
	Body condition	6.409	1.7587	13.28 (1,12)	0.0034
	Cd × body condition	-13.0912	3.4048	14.78 (1,12)	0.0023
	Rest of variables				>0.0604

^a The estimated effect and standard error as well as F values and associated probabilities are shown for those variables that significantly improved the fit of the model

^b t test.

between species and throughout years within species. Regarding the former source of variability, feeding ecology may account, in part, for such interspecific differences. Nestling white storks from Dehesa de Abajo are mainly fed on crayfish, a superabundant food resource in the area [20]. Crayfish is present in the diet of nestling black kites, but fish, juveniles of waterfowl species, and small mammals are also collected by the adult breeders in the nearby area of the nests for feeding their offspring [27]. Differences in prey items consumed as well as in timing and rates of exposure in foraging areas have been related to interspecific variations in levels of metals [28]. Additionally, different metabolic capabilities associated to absorption or detoxification processes may explain variations in sensitivity to effects of heavy metals and As, thus contributing to the species-specific responses [2].

Within species, and looking at the results of the univariable tests, the absence of a clear pattern in the genotoxic response to heavy metals and As is the most characteristic feature to note. Some variables did not show any relationship with DNA damage (e.g., Pb), whereas others had a significant correlation in some years but not in others (e.g., As and body condition in white storks and Cu and Cd in black kites) or only marginal statistical effects in some years but not in others (e.g., Zn

and Cd in white storks and As and body condition in black kites). Interannual consistency is very important when inferring cause-and-effect linkages from contaminant exposure data [29]. Based on this requirement, neither the heavy metals studied nor As seem to be behind the DNA damage observed here. Supporting this, DNA damage in nestlings of both species has, overall, increased with the time elapsed since the mining accident [14], but levels of most heavy metals and As showed the opposite trend. Synergistic, additive, or antagonistic mechanisms between metals and/or with other types of contaminants, such as organochlorines, polycyclic aromatic hydrocarbons, and organophosphate and carbamate pesticides, can greatly modify toxic effects [30] and may contribute to the absence of a clear pattern in the relationships between genotoxic damage and the elements studied here. Although contaminants other than metals were not measured in nestling white storks or black kites from Doñana during the period of study, small mammals (*Mus spretus*) collected in the spill area from 1999 to 2001 have shown biochemical responses that indicate the simultaneous exposure to organic pollutants as well as to the tailings metals [31]. In addition, infertile Falconiforme eggs collected during 1999 and 2000 showed that raptor species from Doñana were exposed to organochlorine pollutants (polychlorinated

dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, polychlorinated biphenyls, and DDTs), the levels of which were, in certain cases, higher than those associated with egg-shell thinning and reduced hatching success [32]. Apart from contaminants, other environmental stresses, such as exposure to cyanobacterial blooms, generate DNA damage [33] and may interfere with the effects of metals. Birds from Doñana have been demonstrated to be exposed to microcystins, the most common group of cyanobacterial hepatotoxins [34].

Despite the interannual variability observed in our results, it seems to be clear that some elements are more related to the DNA damage than others, even at the relatively low levels reported here for nestling white storks and black kites, and that in some cases, the body condition of individuals modulates their effects. This is the case for Cd, which is considered to be a weak genotoxicant in mammals (for review, see Hartwig [35]). An *in vivo* study performed on occupational workers exposed to Cd in a Polish battery plant found a lack of correlation between the level of genotoxic damage with the comet assay and Cd levels in blood (range, 5.4–30.8 µg/L [36]). Contrary to that study, we found that low environmental levels of Cd had a detrimental effect on DNA of black kites in 2000 (range, <0.25–1.8 µg/L) and in 2002 (range, <0.25–0.9 µg/L), being modulated by the body condition of the nestlings in the latter year. Indirect effects related to repair inhibition of the induced DNA damage have been reported at low, non-cytotoxic concentrations of Cd [37]. These indirect effects may be more relevant for populations exposed to mixtures of pollutants, such as ours, by favouring synergistic toxic effects [38]. On the other hand, the role of body condition as a modulating factor in the genetic damage induced by Cd, although it has to be interpreted with caution because of the small sample size, would confirm that weak individuals are more prone to suffer the effects of environmental

pollutants [39]. This adds concern about the synergistic effect of other potential environmental stresses affecting the body condition of individuals (e.g., reduced availability of food resources, parasites, etc.).

The positive effect of body condition on DNA damage in nestling black kites in two of the four years of monitoring was an unexpected result. Despite the fact that such a relationship was not tested previously in birds or any other taxa, results based on the response of other biomarkers (e.g., immune response) suggest, *a priori*, the opposite trend [22]. Thus, further research is needed.

The present study provides chemical and biological data for wild nestling white storks and black kites from an area that was severely polluted as a consequence of a mining accident, indicating that overall, average levels of most heavy metals and As were lower than values reported in the literature for conspecifics known to be exposed to metal pollution, showing a tendency to decrease in both species during monitoring. It also shows that the two bird species differed in their genotoxic response to metals and As pollution and that no clear pattern of association exists between the most abundant heavy metals and metalloids in the toxic spill and the DNA damage in nestlings of both species throughout the four years of monitoring. In the context of the interannual variations, it is also important to note that nest identity in white storks appeared as a relevant factor in some years but not in others. This may indicate a different exposure to genotoxicants depending on the year of monitoring, probably associated with the availability of food resources in the area, which needs further investigation. Together with the interspecific differences in the response and the within-species interannual variations in the relationships between DNA damage and levels of heavy metals and As, this supports long-term monitoring plans to assess the impact of environmental contami-

nants in populations and ecosystems. The wide range of stressors that animal populations might experience in the wild makes those findings in single-year studies can be seen as identifiers of potential relevant links between pollutants and effects, but they may not serve as general rules even for the species and populations under study because of the so-far-unconsidered interannual variability. On the other hand, variations in sensitivity or exposure of various species to different pollutants require that several species be studied, as exemplified in the present and other studies [2]. Including several species with different life histories and foraging tactics enables us to cover a broader scale of direct and indirect effects of pollutants than would have been possible with one species only.

In conclusion, our results indicate that nestling white storks and black kites were affected, in part, by the elements studied, even

at the low levels reported. However, these trace elements alone do not satisfactorily explain the observed DNA damage. Genotoxicants other than metals, such as organochlorines, polycyclic aromatic hydrocarbons, and/or organophosphate and carbamate pesticides related to the agricultural activities in the proximity to the study area (mainly rice production), may contribute directly or indirectly to the observed damage [30,40]. Clearly, a combination of factors is involved in the genotoxic damage seen with the comet assay in these wild birds that requires further investigation, especially after the increase observed during the period of study [14]. Long-term ongoing monitoring of both species needs to continue to provide a better knowledge and understanding of these relationships as well as the potential effects that metals and/or organic contaminants may have on the health of Doñana bird populations and ecosystems.

REFERENCES

1. Beyer WN, Dalgarn J, Dudding S, French JB, Mateo R, Miesner J, Sileo L, Spann J. 2004. Zinc and lead poisoning in wild birds in the Tri-State Mining District (Oklahoma, Kansas, and Missouri). *Arch Environ Contam Toxicol* 48: 108–117.
2. Eeva T, Lehikoinen E. 1996. Growth and mortality of nestlings great tits (*Parus major*) and pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) in a heavy metal pollution gradient. *Oecologia* 108: 631–639.
3. Grimalt JO, Ferrer M, Macpherson E. 1999. The mine tailing accident in Aznalcóllar. *Sci Total Environ* 242: 3–11.
4. Fossi MC. 1994. Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environ Health Perspect* 102: 49–54.
5. Heuser VD, Da Silva J, Moriske H-J, Dias JF, Yoneama ML, De Freitas TRO. 2002. Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus tests in native rodent *Ctenomys minutus*. *Environ Mol Mutagen* 40: 227–235.
6. Mitchelmore CL, Chipman JK. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res* 399: 135–147.
7. Anderson SL, Wild GC. 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environ Health Perspect* 102(Suppl.12): 9–12.
8. Cramp S, Simmons KEL. 1980. *The Birds of the Western Palearctic*. Oxford University Press, Oxford, UK.
9. Peakall D, Burger J. 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: Speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicol Environ Saf* 56: 110–121.
10. Blanco G, Frías O, Jiménez B, Gómez G. 2003. Factors influencing variability and potential uptake routes of heavy metals in black kites exposed to emissions from a solid-waste incinerator. *Environ Toxicol Chem* 22: 2711–2718.
11. Tucker GM, Heath MF. 1994. *Birds in Europe: Their Conservation Status*. Birdlife International, Cambridge, UK.
12. Pastor N, López-Lázaro M, Tella JL, Baos R, Hiraldo F, Cortés F. 2001. Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*) after the Doñana Ecological Disaster. *Mutagenesis* 16: 219–223.
13. Pastor N, López-Lázaro M, Tella JL, Baos R, Hiraldo F, Cortés F. 2001. DNA damage in birds after the mining waste spill in southwestern Spain: A comet assay evaluation. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20:3 09–316.
14. Pastor N, Baos R, López-Lázaro M, Jovani R, Tella JL, Hajji N, Hiraldo F, Cortés F. 2004. A four-year follow-up analysis of genotoxic damage in birds of the Doñana area (SW Spain) in the wake of the 1998 mining waste spill. *Mutagenesis* 19: 61–65.
15. Cotellet S, Féraud JF. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environ Mol Mutagen* 34: 246–255.
16. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184–191.
17. Custer TW, Custer CM, Hines RK, Sparks DW, Melancon MJ, Hoffman DJ, Bickham JW, Wickliffe JK. 2000. Mixed-function oxygenases, oxidative stress, and chromosomal damage measured in lesser scaup wintering on the Indiana Harbor Canal. *Arch Environ Contam Toxicol* 38: 522–529.
18. Rojas E, Herrera LA, Poirier LA, Ostrosky-Wegman P. 1999. Are metals dietary carcinogens? *Mutat Res* 443: 157–181.
19. Baos R, Jovani R, Forero MG, Tella JL, Gómez G, Jiménez B, González MJ, Hiraldo F. Relationships between T-cell-mediated immune response and Pb, Zn, Cu, Cd, and As concentrations in blood of nestling white stork (*Ciconia ciconia*) and black kite (*Milvus migrans*) from Doñana (southwestern Spain) after the Aznalcóllar toxic spill. *Environ Toxicol Chem* 25: 1153–1159.
20. Negro JJ, Tella JL, Blanco G, Forero MG, Garrido-Fernández J. 2000. Diet explains interpopulation variation of plasma carotenoids and skin pigmentation in nestling white storks. *Physiol Biochem Zool* 73: 97–101.
21. Viñuela J, Bustamante J. 1992. Effect of growth and hatching asynchrony on the fledging age of black and red kite. *Auk* 109: 748–757.
22. Jovani R, Tella JL, Blanco G, Bertellotti M. 2004. Variable interannual relationships be-

- tween T-cell mediated immunity and individual traits in white storks. *Ardeola* 51: 357–364.
23. Olive PL, Banath JP, Durand RE. 1990. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *J Natl Cancer Inst* 82: 779–783.
24. Gaines SD, Rice WR. 1990. Analysis of biological data when there are ordered expectations. *Am Nat* 135: 310–317.
25. Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD. 1996. *SAS System for Mixed Models*. SAS Institute, Cary, NC, USA.
26. Franson J. 1996. Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl. In Beyer NW, Heinz GH, Redmon-Norwood AW, eds, *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 265–279.
27. Veiga JP, Hiraldo F. 1990. Food habits and the survival and growth of nestlings in two sympatric kites (*Milvus milvus* and *Milvus migrans*). *Holarct Ecol* 13: 62–71.
28. Savinov VM, Gabrielsen GW, Savinova TN. 2003. Cadmium, zinc, copper, arsenic, selenium, and mercury in seabirds from the Barent Sea: Levels, interspecific, and geographical differences. *Sci Total Environ* 306: 133–158.
29. Fox GA. 1991. Practical causal inference for eco-epidemiologists. *J Toxicol Environ Health* 33: 359–373.
30. Teles M, Pacheco M, Santos MA. 2005. Physiological and genetic responses of European eel (*Anguilla anguilla* L.) to short-term chromium or copper exposure—Influence of preexposure to a PAH-like compound. *Environ Toxicol* 20: 92–99.
31. Bonilla-Valverde D, Ruiz-Laguna J, Muñoz A, Ballesteros J, Lorenzo F, Gómez-Ariza JL, López-Barea J. 2004. Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers. *Toxicology* 197: 123–38.
32. Gómara B, Fernández MA, Baos R, Herrero L, Jiménez B, Abad E, Hiraldo F, Ferrer M, Rivera J, González MJ. 2002. Presence of organochlorine pollutants (PCDDs, PCDFs, PCBs, and DDTs) in eggs of predatory birds from Doñana National Park, Spain. *Organohalogen Compounds* 58: 441–444.
33. Mankiewicz J, Walter Z, Tarczynska M, Palyvoda O, Wojtysiak-Staniaszczyk M, Zalewski M. 2002. Genotoxicity of cyanobacterial extracts containing microcystins from Polish water reservoirs as determined by SOS chromotest and comet assay. *Environ Toxicol* 17: 341–350.
34. Alonso-Andicoberry C, García-Villada L, Costas E. 2002. Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria. *Vet Rec* 7: 706–707.
35. Hartwig A. 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 8: 3–11.
36. Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan AT, Nilsson R. 2003. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res* 540: 19–28.
37. Hartwig A, Schwerdtle T. 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: Toxicological implications. *Toxicol Lett* 127: 47–54.
38. Pruski AM, Dixon DR. 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat Toxicol* 57: 127–137.
39. Di Giulio RT, Scanlon PF. 1985. Effects of cadmium ingestion and food restriction on energy metabolism and tissue metal concentrations in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Environ Res* 37: 433–444.
40. Bolognesi C. 2003. Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. *Mutat Res* 543: 251–272.

Acknowledgments

We are indebted to those people who helped to collect samples, especially G. García, F.G. Vilches, M. Guerrero, J.M. Terrero, J. Blas, M.C. Quintero, R. Rodríguez, M. García, S. Cabezas, M.G. Forero, J.M. Grande, F.J. Hernández, H. Lefranc, A. Sánchez, M.C. Medina, M. Ardila, and the Equipo de Seguimiento de la Estación Biológica de Doñana. R. Díaz-Delgado (LAST-EBD) helped with Figure 1.

We also thank C. Tabera and V. Benito for analyzing metals, N. Aull for improving the English, and C.M. Herrera for statistical advice. This project received financial support from Ministerio de Ciencia y Tecnología and Fondos Feder (B0S2002-00857), Telefónica Móviles S.A., and Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. R. Baos was supported from a FPU fellowship (Ministerio de Educación y Cultura) and an I3P grant (EGMASA, European Union).

CAPÍTULO 3



Adrenocortical Response to Stress and Thyroid Hormone Status in Free-Living Nestling White Storks (*Ciconia ciconia*) Exposed to Heavy Metal and Arsenic Contamination

Raquel Baos¹, Julio Blas², Gary R. Bortolotti², Tracy A. Marchant², and Fernando Hiraldo¹

¹ Department of Applied Biology, Estación Biológica de Doñana, Sevilla, Spain

² Department of Biology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

ABSTRACT

Background/Objective: Endocrine parameters have proven useful in the detection of early or low-level responses to pollutants. Although most of the studies on endocrine modulation have been focused on processes involving gonadal steroids, contaminants may target other parts of the endocrine system as well. In this study we examined the adrenocortical stress response and thyroid hormone status in free-living nestling white storks (*Ciconia ciconia*) in relation to heavy metals (zinc, lead, copper, cadmium) and arsenic levels in blood.

Methods: Fieldwork was conducted in an area polluted by the Aznalcóllar mine accident (south-western Spain) and in a reference site. We used a standardized capture, handling, and restraint protocol to determine both baseline and maximum plasma corticosterone. Circulating levels of thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) were also measured.

Results: No effects of metals or As were found on baseline corticosterone, but maximum levels of corticosterone were positively related to Pb in both locations. This relationship was stronger in single nestlings than in birds from multiple-chick broods, which suggests a greater impact of Pb on more stressed individuals. Metal pollution did not affect plasma T₄ or T₃ levels, although thyroid status differed with location.

Conclusions: Because a compromised hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) function can have far-reaching consequences in terms of altered behavioral and metabolic processes necessary for survival, our results suggest that birds exposed to sublethal Pb levels may be at risk through an altered adrenocortical stress response, and further support the idea that HPA axis-related end points might be useful indicators of metal exposure and potential toxicity in wild animals.

Key Words: Aznalcóllar Corticosterone Free-living birds Handling-restraint protocol Lead Metal pollution Stress response Thyroxine Triiodothyronine White stork

INTRODUCTION

In nature, animals can be used as bioindicators to provide an early warning of potential adverse, contaminant-related effects on organisms or populations themselves, on organisms or populations that prey upon them, and as sentinels for exposure and effects on humans (Fox 2001).

Endocrine assessment is a useful diagnostic tool in the detection of early or low-level responses to pollutants, responses that may precede more significant health problems (Kendall et al. 1998). Although most of the studies on endocrine disruption or modulation have been focused on reproductive problems and behavioral abnormalities related to reproduction, contaminants may target other parts of the endocrine system more commonly than they disrupt processes involving gonadal steroids (Damstra et al. 2002; Hinson and Raven 2006). The hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis is an important system that regulates and integrates many physiologic functions in response to environmental stressors (Wingfield and Kitaysky 2002). Activation of the HPA axis during a stress response results in glucocorticoid secretion from the adrenal glands (mainly corticosterone in birds). This, in turn, initiates several important physiologic changes including effects on intermediary metabolism, growth, immune function, and inflammatory responses (reviewed by Kitaysky et al. 2003; Sapolsky et al. 2000). Thyroid hormones—thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3)—also play an important role in metabolism and exert profound effects on avian development (both differentiation and growth) (McNabb 2000).

The impairment of adrenal or thyroid function by contaminant exposure may occur in the absence of gross toxicologic effects and may be critical to developing individuals, with severe consequences such as reduced growth, reduced cognitive capabilities, and impaired immune function (Schantz and Widholm 2001; Smits et al. 2002; Vos et al. 2000).

This may result in permanent alterations in the functional capacity of these individuals, with negative long-term consequences to survival and overall fitness (McArthur et al. 1983). Although abnormal glucocorticoid concentrations and impaired functioning of the HPA axis, as well as thyroid modulation, have been linked to exposure to different classes of pollutants (Leatherland 2000; Lorenzen et al. 1999; Mayne et al. 2004, 2005; Smits et al. 2002; Vos et al. 2000; Vyskocil et al. 1990), little is known about the effects of sublethal metal exposure on the adrenal and thyroid systems in free-living birds (Wayland et al. 2002, 2003). Particularly lacking are studies of endocrine modulation in altricial species (Scannes and McNabb 2003).

We conducted a field study to examine the relationships between exposure to heavy metals (zinc, copper, lead, cadmium) and arsenic and the adrenocortical response to stress in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) hatched in the area affected by the Aznalcóllar mine accident (southwestern Spain) (Grimalt et al. 1999), and in a reference location for comparison. We also evaluated the potential effects of metal pollution on thyroid hormone status in these two groups. Previous studies in the area affected by the mine spill have reported higher genotoxic damage in nestling storks than in controls, with damage having increased 2- to 10-fold between 1999 and 2002 (Pastor et al. 2004). Additionally, nestling storks hatched in the years after the accident had skeletal deformities that were partially related to metal pollution (Smits et al. 2005).

We used a standardized capture, handling, and restraint protocol to assess the adrenocortical response to stress (Wingfield and Kitaysky 2002), and both baseline and maximum plasma corticosterone, as well as plasma T_4 and T_3 levels were studied in relation to heavy metals and As concentrations in blood. The effects of other potentially confounding factors affecting endocrine status, such as location, brood size, age, body condition, and sex, were also considered.

MATERIALS AND METHODS

Bird species and study area

The white stork is a large (2,200–4,400 g), long-lived wading bird that breeds from North Africa to northern Europe. At Iberian latitudes, it has a prolonged breeding season (from February to July), with chicks hatching after 33–34 days of incubation and depending on both adults for food and shelter during approximately 75 days before fledging (Cramp and Simmons 1980).

Fieldwork was conducted in two colonies in southwestern and midwestern Spain during spring 2000. The exposed colony was situated in the Dehesa de Abajo (DdA; Puebla del Río, Sevilla, southwestern Spain), in the vicinity of Doñana National Park and only 1 km from the area affected by the Aznalcóllar mine spill in 1998 (Baos et al. 2006). In this colony, white storks breed in open nests at the top of wild olive trees. During the study, about 300 pairs of storks bred at DdA, one of the largest colonies in the western Palearctic (Pastor et al. 2004). The ecologic features of the exposed colony that may influence the results of our study, such as its size (number of breeding pairs), density of breeders, nestlings' diet [mainly crayfish; see Blas et al. (2005) for details], and its unique location in relation to anthropogenic disturbance (McNabb 2000; Mullner et al. 2004; Silverin 1998), seriously limited the number of colonies we could use as reference. In addition, a reference colony would have to be located far enough away to ensure that there would not be overlap in the use of habitat during the breeding season. Considering all of these requirements, the most suitable colony for a reference was in Cáceres province (CC), about 230 km north of DdA. The reference colony, approximately 50 breeding pairs, was in a scattered oak forest surrounded by crop fields and close to a permanent water source, with crayfish present. Although there were no existing data on metal

contamination for this colony, it was located in a natural area far from urban environments and other apparent sources of pollution. Nevertheless, actual metal levels were measured in birds from both colonies for a proper characterization of metal contamination.

Field procedure and blood sampling

During the first week of June 2000, randomly selected nests of single-chick broods ($n = 5$ in each colony), and two- or three-chick broods (DdA, $n = 15$; CC, $n = 10$) were sampled at both colonies. Blood sampling for hormone and metal residue determinations were performed for either the single nestling or, in the case of two- and three-chick nests, for both the oldest and the youngest birds within a brood (DdA, $n = 35$; CC, $n = 23$ birds). Storks underwent a standardized capture, handling, and restraint protocol known to elicit an increase in circulating corticosterone in birds (Wingfield and Kitaysky 2002). Blood samples (~ 1 mL) were taken from the brachial vein within the first minute after capture, and again at 2, 10, 30, and 45 min [see Blas et al. (2005) for detailed description of the sampling protocol]. A greater amount of blood (2–3 mL) was taken 45 min after capture, transferred to a separate vial (1–2 mL), and frozen immediately at -80°C for determination of heavy metals and As. All birds were individually marked with metal and plastic bands, and their wing-chord length and body mass were measured before they were returned to the nest.

Blood samples for hormone determination were kept on ice until centrifuged (3,000 rpm for 10 min) the same day of capture, and plasma was frozen and stored at -80°C for radioimmunoassay (RIA). Thyroid hormones were quantified in plasma samples taken 2 min postcapture.

The age of nestlings, estimated following the method described by Chozas (1983), ranged between 24 and 59 days. We calculated a body condition index as the individu-

al's residual value from a reduced major axis regression of \log_{10} -body mass on \log_{10} -wing-chord length, following the method of Green (2001). Sex determination was performed through DNA analyses on blood (Ellegren 1996).

This project was approved by the Spanish Animal Care Committee for research involving animals, and the permission to capture nestling white storks at DdA and CC was given by the environmental agencies of the governments of Andalusia and Extremadura, respectively. Birds were treated humanely and with regard for alleviation of suffering during handling.

Determination of corticosterone and thyroid hormones

We used RIAs to quantify plasma concentrations of corticosterone and thyroid hormones (T_4 , T_3). In all assays, samples were measured in duplicate, and internal control samples containing known amounts of the hormones were included to ensure that the accuracy of each assay was high and to determine between-assay and within-assay variability. Serial dilutions of samples produced displacement curves that were parallel with each hormone standard curve, indicating that the RIAs were suitable for measuring circulating hormone levels in storks. For corticosterone, samples from the present study were analyzed in the same series of RIAs reported previously (Blas et al. 2005); the assay procedures and parameters were detailed in the same study.

Circulating thyroid hormones are mostly bound to plasma proteins, with only a small amount circulating as free (unbound) hormones. We determined total amounts (i.e., bound plus unbound) of T_4 and T_3 in unextracted serum following procedures and reagents described by Smits et al. (2002). These RIAs use 150 μ g 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid in each assay tube, and barbital buffer

to eliminate interference of serum binding proteins. Samples were diluted 4- to 10-fold prior to use in the assays and measured near the midrange of the standard curves. This was well above the minimum limits of detection (LOD) of 62 pg/mL of plasma for T_3 and 372 pg/mL of plasma for T_4 . All samples were measured in a single T_3 or T_4 RIA; the percent coefficient of variation (%CV) within the T_3 RIA was 7.4%, whereas the %CV within the T_4 RIA was 6.3%.

Antiserum and purified hormones used for standards were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA); labeled steroids were purchased from New England Nuclear (Mandel Scientific, Guelph, Ontario, Canada).

Determination of heavy metals and As

We followed the methodology of Benito et al. (1999) for determination of Pb, Zn, Cu, Cd, and As. Blood samples (1 mL) were prepared using a 30-min ultrasonic extraction with Triton X-100 (Merck Farma y Química, S.A., Valencia, Spain). Zn was analyzed by flow injection-flame-atomic absorption spectrometry using an atomic absorption spectrometer (model 3300) equipped with a flow injection analysis system for atomic spectroscopy (FIAS-400) and an autosampler (AS-90; PerkinElmer Hispania, S.A., Madrid, Spain). Pb, As, Cu, and Cd were measured using a longitudinal AC Zeeman (AAnalyst 600) atomic absorption spectrometer equipped with a transversely heated graphite atomizer and pyrolytic graphite-coated tubes with inserted L'vov platform (PerkinElmer Hispania, S.A.). Calibration was performed following the method of additions standard curve (Benito et al. 1999). The LODs were 0.23 mg/L for Zn, 2 μ g/L for Pb, 24 μ g/L for As, 13 μ g/L for Cu, and 0.10 μ g/L for Cd. Analytical results under the LOD were set to half the respective LOD. The precision as measured by triplicate analysis, expressed as the relative SD, was always

Table 1. Mean \pm SD (range) of heavy metals and arsenic ($\mu\text{g/L}$ or mg/L wet weight) in blood of nestling white storks according to colony location.

Colony location ^a	Cu ($\mu\text{g/L}$)	Pb ($\mu\text{g/L}$)	Zn (mg/L)	As ($\mu\text{g/L}$)
CC (reference)	359.5 \pm 55.5 (233–451) <i>n</i> = 23	90.7 \pm 51.0 (6–214) <i>n</i> = 23	2.8 \pm 0.5 (1.8–3.8) <i>n</i> = 22	48.6 \pm 46.8 (ND–205) <i>n</i> = 20
DdA (exposed)	357.2 \pm 41.1 (247–426) <i>n</i> = 34	44.4 \pm 33.6 (ND–126) <i>n</i> = 35	2.9 \pm 0.4 (2.1–3.7) <i>n</i> = 35	34.5 \pm 51.4 (ND–248) <i>n</i> = 32

ND, below the LOD (see “Materials and Methods” for details).

^aResults of GLMMs testing for differences between colony locations using normal error and identity link function (nest = random factor): Cu, $F_{1,33} = 0.05$, $p = 0.829$; Pb, $F_{1,33} = 7.59$, $p = 0.010$; Zn, $F_{1,33} = 0.31$, $p = 0.579$; As, $F_{1,31} = 3.11$, $p = 0.088$.

< 10%. The range of recovery evaluated by spiking blood samples with each of the elements was 85–115%. We established accuracy for Pb and Cd by analyzing certified reference sample of bovine blood (CRM-195; Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium). For As, and Cu, we used a certified reference sample, TORT-2 (lobster hepatopancreas; National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, Canada). The International Atomic Energy Agency (Vienna, Austria) provided an A-13 reference sample of animal blood for Zn accuracy. The values obtained for all of these elements were consistent with the certified reference values.

Statistical analyses

To test whether heavy metals and As were related to hormone levels, we analyzed baseline and maximum recorded corticosterone and plasma T_4 and T_3 concentrations separately through general linear mixed models (GLMMs) using the MIXED Procedure of SAS (SAS Institute 2001), which simultaneously accounts for random effects, fixed effects, and covariates. When necessary, dependent variables were \log_{10} -transformed to obtain a normal distribution. Concentrations of heavy metals and As were \log_{10} -transformed, when necessary, and were included in the models as covariates. We controlled for the potential effects of colony location, brood size, age, sex, and body condition (Blas et al. 2005, 2006) by including them in the models as either fixed factors (colony location, brood size,

sex) or covariates (age, body condition). All of the two-way interactions between metals, As, and the rest of the variables were also tested. We considered baseline corticosterone concentration and time (in minutes following capture) to reach the maximum recorded levels as covariates in the analysis performed on the induced response to stress. T_4 and T_3 levels were also taken into account as appropriate in the models to test thyroid status. Brood size was categorized as either single- (one-chick nests) or multiple-chick broods (two- or three-chicks nests), because we found no differences in either baseline or stress-induced corticosterone levels between nestlings from two- and three-chick nests (Blas et al. 2005). To avoid pseudoreplication derived from the lack of independence in values from nestlings within the same brood and sharing the same colony, we included the nest as a random variable (nested into colony; Littell et al. 1996).

The models were constructed by a stepwise forward procedure, testing the significance of each variable and adding only the variable that resulted in a better fit to the model (Baos et al. 2006). Final (i.e., minimum adequate) models retained only those terms showing a significant effect on hormone concentrations at a > 5% rejection probability. All tests were two-tailed.

RESULTS

Heavy metals and As levels

Concentrations of Cu, Zn, and As did not differ between locations (Table 1). Pb levels were

Table 2. Summary of results from the GLMM explaining stress-induced response (i.e., maximum corticosterone concentration after 45 min of handling and restraint) in nestling white storks ($n = 58$ birds).

Effect	Estimate	SE	F-Value (df)	p-Value
Intercept	16.660	7.666	2.17 ^a (32)	0.037
Baseline corticosterone	0.246	0.113	4.69 (1,20)	0.043
Age	0.349	0.134	6.74 (1,20)	0.017
Brood size	-38.160 ^b	16.484	5.36 (1,20)	0.031
Pb (log)	3.596	2.892	10.93 (1,20)	0.004
Pb (log) \times brood size	25.941 ^b	9.601	7.30 (1,20)	0.014
All other effects			< 2.80	> 0.113

df, degrees of freedom. The estimated effect, SE, F -values, and associated probabilities are shown for those variables that significantly improved the fit of the model.

^a t -Test. ^bEstimate corresponds to brood size = 1.

significantly higher in nestling storks from the reference colony (Table 1), although only one individual from CC (4.3 %; $n = 23$) and none from DdA showed Pb concentrations > 200 $\mu\text{g/L}$, the value reported to cause sublethal effects in birds (Franson et al. 1996). All blood Cd concentrations were < LOD (0.10 $\mu\text{g/L}$) in both locations; therefore, Cd was not considered in subsequent analyses.

Relationships between hormone concentrations, heavy metals, and As levels

Baseline corticosterone

We found no significant relationships between heavy metals or As and baseline corticosterone levels, either tested alone ($F < 2.78$; $p > 0.110$) or through interactions with colony location, brood size, age, sex, and body condition ($F < 1.60$; $p > 0.222$). Only colony location ($F_{1,32} = 35.91$; $p < 0.0001$) and brood size ($F_{1,23} = 6.03$; $p = 0.022$) were related to baseline levels of corticosterone, with birds from CC showing higher hormone concentrations (mean \pm SD, 30.6 ± 11.6 ng/mL; $n = 23$) than those from DdA (14.1 ± 7.3 ng/mL; $n = 35$), and single nestlings showing higher levels (32.3 ± 17.3 ng/mL; $n = 10$) than birds from multiple-chick broods (18.2 ± 9.4 ng/mL; $n = 48$).

Stress-induced corticosterone

Maximum corticosterone concentration was positively related to blood Pb levels ($F_{1,20} =$

10.93; $p = 0.004$; Table 2) in both colony locations (interaction term, Pb \times colony, $F_{1,19} = 0.58$; $p = 0.456$), and singletons had higher levels of corticosterone (53.3 ± 14.6 ng/mL; $n = 10$) than nestlings from multiple-chick broods (42.9 ± 9.3 ng/mL; $n = 48$; $F_{1,20} = 5.36$; $p = 0.031$; Table 2). The interaction term Pb \times brood size was also significant ($F_{1,20} = 7.30$; $p = 0.014$), suggesting that Pb had a greater effect on the stress-induced corticosterone of single nestlings than on those of multiple-chick broods (Table 2, Figure 1). Neither Cu, Zn, nor As levels alone or as part of interaction terms showed any significant relationship with maximum corticosterone values ($F < 2.80$; $p > 0.113$). Age was positively related to the stress-induced corticosterone secreted

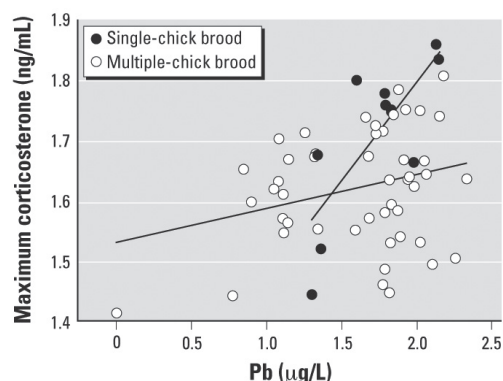


Figure 1. Relationships between Pb levels (log- $\mu\text{g/L}$) in blood and the stress-induced response (i.e., maximum corticosterone concentration, log-ng/mL) in nestling white storks from single chick-broods ($n = 10$) and multiple-chick broods ($n = 48$) after 45 min of handling and restraint (from both colonies).

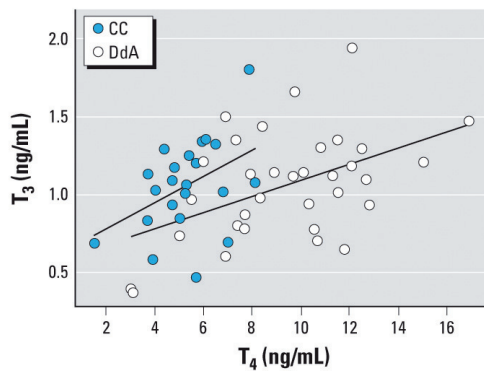


Figure 2. Relationship between plasma T_4 and T_3 concentrations in nestling white storks from CC (reference) and DdA (exposed) colonies.

after applying our handling and restraint protocol ($F_{1,20} = 6.74$; $p = 0.017$; Table 2). The final model also included a positive association between baseline and maximum corticosterone concentrations ($F_{1,20} = 4.69$; $p = 0.043$; Table 2), but neither sex, body condition, nor time elapsed to reach the maximum hormone concentration showed a significant effect.

Thyroid hormones

The analysis of plasma T_3 levels revealed that neither heavy metals, As concentrations, brood size, sex, age, body condition, nor any of the interaction terms accounted for differences in hormone levels ($F < 3.34$; $p > 0.085$). Plasma T_4 concentrations were positively related to T_3 ($F_{1,21} = 13.20$; $p = 0.002$) as expected, given that T_4 is the precursor of active T_3 . Although absolute T_3 levels were similar between colonies (CC, 1.05 ± 0.3 ng/mL, $n = 23$; DdA, 1.09 ± 0.4 ng/mL, $n = 35$), when controlling for T_4 the model showed a significant effect of location ($F_{1,31} = 4.67$; $p = 0.039$).

Regarding the variables affecting T_4 concentrations, only colony location had a significant effect, being higher in DdA (9.5 ± 3.2 ng/mL; $n = 33$) than in CC nestlings (5.3 ± 1.5 ng/mL; $n = 22$; $F_{1,31} = 40.41$; $p < 0.0001$). No remaining variables or interactions were significant in the final model accounting for variation in plasma T_4 ($F < 3.19$; $p > 0.089$).

Both models suggest that for a given level of T_3 (which was similar between colonies), birds from DdA had higher levels of the precursor T_4 (Figure 2).

DISCUSSION

Heavy metals and As levels

Blood levels of essential metals Cu and Zn were similar between colony locations, and generally lower than those reported in bird populations from other metal-polluted areas (Beyer et al. 2004; Van Eeden and Schoonbee 1996). Contrary to our expectations, nestlings from the reference colony (CC) had higher blood Pb levels than those sampled in DdA. Nevertheless, Pb levels > 200 $\mu\text{g/L}$, the value reported to cause sublethal effects in birds (Franson 1996), were found in only one nestling from CC, with the remaining individuals from both CC and DdA having “background” concentrations. When working with wildlife, one major difficulty rests with the establishment of an absolute control condition, when in fact the best option may be a reference population for comparison. Although no previous studies on any pollutant had been conducted in the reference location, the stork colony was in a natural area far from apparent sources of contamination. This result supports the argument of Norris (2000) that the widespread distribution of many potential endocrine-modulating substances makes it difficult, if not impossible, to find a true control population. Blood levels of As were found at concentrations below those reported in birds from contaminated areas (Burger and Gochfeld 1997) and were similar between the two sampled locations.

Relationships between hormone concentrations, heavy metals, and As levels

Our results showed a positive association between Pb and the stress-induced response elicited after 45 min of handling and restraint

regardless of colony location. Of particular importance is that this relationship occurred at Pb levels below those normally associated with detrimental health effects in birds (Franson 1996). Recent experimental and field studies on passerines exposed to Pb have reported no effect on the stress response (Eeva et al. 2003, 2005; Snoeijs et al. 2005); however, these studies measured corticosterone levels just after capture (i.e., baseline concentrations) for which we also did not find a significant relationship.

Lead ranks second on the list of top 20 hazardous substances from the 2005 CERCLA (Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act) Priority List [Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2005]. The widespread use of lead arsenate as a pesticide in the early 20th century left a broad legacy of soil and groundwater contamination. Recent or past lead-shot hunting, mining, and smelting activities and industrial effluents are other sources of Pb that have made this element one of the most common metals in contaminated ecosystems (ATSDR 1999). Exposure to Pb is associated with neurobehavioral, hematologic, nephrotoxic, and reproductive effects in birds and other animals (Scheuhammer 1987). Experimental studies in mammals have shown that both adult and developmental Pb exposure elevate baseline corticosterone levels (Cory-Slechta et al. 2004; Der et al. 1977; Vyskocil et al. 1990); however, similar effects have not been reported on stress-induced response in either mammals or avian species. Therefore, we cannot discount other factors potentially correlated with Pb (e.g., pesticide exposure) that may contribute to some degree to the positive relationship we found in storks between Pb and the stress response. Experimental studies are needed to establish a cause–effect relationship.

In the present study we also found that the association between Pb and the stress-

induced response was greater for birds from single-chick broods than for those from multiple-chick broods. In a previous article (Blas et al. 2005), we reported that single nestlings were reared in nests that experienced brood reduction, which suggested lower parental quality. Reduced attendance by young or inexperienced parents may lead singletons to suffer from environmental stressors other than Pb (e.g., a greater exposure to harsh weather conditions). This in turn may explain both their higher levels of maximum corticosterone (Blas et al. 2005) and the stronger relationship between their induced response to stress and Pb. In a recent experimental study on rats, Cory-Slechta et al. (2004) provide evidence that Pb exposure and stress interact. Furthermore, the fact that both stress and Pb target brain mesocorticolimbic dopaminergic systems (e.g., Barrot et al. 2000; Cory-Slechta et al. 1997) provides a biological basis for such an interaction. Di Giulio and Scanlon (1985) reported that the highest plasma and adrenal concentrations of corticosterone were observed in ducks receiving the highest level of dietary cadmium when they were food-restricted. Similarly, Wayland et al. (2002) found significant correlations between renal Cd concentration and the stress response of female common eiders (*Somateria mollissima borealis*) during the incubating period, when they are reported to fast, whereas no effects were detected in prenesting females. In this sense, although it has to be interpreted with caution because of the small sample size, our result would support the argument that contaminants acting in concert with other stressors may have a greater impact on individuals or populations than would be elicited by either the contaminants or other stressors acting alone.

Although temporary increases in corticosterone are believed to be beneficial, serving to redirect individuals' behavior and physiology to foraging or self-maintenance

and to enhance assimilation of energy during the stressful period, chronic or frequent activation of the stress response can be deleterious, resulting in growth suppression, reproductive dysfunction, and immunosuppression (Wingfield and Kitaysky 2002). The brain is also a target of the adverse effects of prolonged elevation of glucocorticosteroids (Kerr et al. 1991), with deleterious effects that may include impairment of cognitive function (Kitaysky et al. 2003). Thus, a compromised HPA function by Pb, alone or in conjunction with other environmental stressors, could have far-reaching consequences in terms of altered behavioral and metabolic processes necessary for survival.

Few studies have reported the effects of metal pollution on the homeostasis of thyroid hormones in birds, especially in natural settings (Leatherland 2000). In the present study, neither heavy metals nor As were related to circulating levels of thyroid hormones. However, lower levels of T_4 were found in the location with higher concentrations of Pb (CC, the reference site). Although this result may suggest that circulating levels of T_4 are susceptible to Pb exposure in nestling storks, colony location and not Pb levels accounted for differences in plasma T_4 . The studies reporting Pb effects on circulating thyroid hormones have focused on heavily exposed subjects, often with other manifestations of lead poisoning (Robins et al. 1983; but see also Refowitz 1984). Thus, a possible explanation for the lack of significant relationships between Pb and plasma thyroid hormones is that metal levels measured in nestling storks were too low to exhibit a significant correlation. Alternatively, location-dependent intrinsic (e.g., genetic) or extrinsic (e.g., environmental) factors other than variation in Pb, including pollutants other than those analyzed (e.g., polychlorinated biphenyls, dioxins, pesticides) could potentially account for our results.

CONCLUSIONS

The present study provides, to our knowledge, the first evidence that Pb may adversely affect the HPA axis function of wild birds. The association we found occurs at Pb levels below those reported to cause sublethal effects in avian species, and further supports the idea that HPA axis-related end points may be useful indicators of metal exposure and potential toxicity in wild animals. Experimental studies in this regard are strongly encouraged.

Our results indicate that a simple handling and restraint protocol may be a better approach to assess the HPA axis function than a single measurement taken after capture. Plasma corticosterone is a static measure by itself and does not provide information concerning the dynamic nature of the system (Hinson and Raven 2006; Norris 2000).

This work also supports the idea that greater attention to the problems arising from interactions between different types of stressors must certainly be considered, especially when working in the wild, given that such a scenario (and not the exposure to isolated sources of stress) constitutes the environmental reality.

The persistence of Pb, combined with the sensitivity of the HPA axis to contaminant insult, suggests that exposure to this metal even at sublethal levels may cause delayed functional deficits later in development. Endangered species and/or populations exposed to additional stress factors (e.g., nutrition deficiency, parasitism) would be of special concern. Further field studies involving birds from these and other metal-polluted sites are required to determine the extent to which the corticosterone response systems of wild birds are affected by exposure to Pb as well as the long-term effects on survival and overall fitness.

Thyroid status was not related to metal pollution, although we found differences between colony locations that deserve further investigation.

REFERENCES

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1999. Toxicological Profile for Lead. Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.html> [accessed 16 June 2006].
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2005. 2005 CERCLA Priority List of Hazardous Substances. Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html> [accessed 16 June 2006].
- Baos R, Jovani R, Forero MG, Tella JL, Gómez G, Jiménez B, et al. 2006. Relationships between T-cell-mediated immune response and Pb, Zn, Cu, Cd, and As concentrations in blood of nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from Doñana (south-western Spain) after the Aznalcóllar toxic spill. *Environ Toxicol Chem* 25(4): 1153–1159.
- Barrot M, Marinelli M, Arous DN, Rouge-Pont F, Le Moal M, Piazza PV. 2000. The dopaminergic hyper-responsiveness of the shell of the nucleus accumbens is hormone-dependent. *Eur J Neurosci* 12: 973–979.
- Benito V, Devesa V, Muñoz O, Suñer MA, Montoro R, Baos R, et al. 1999. Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine. *Sci Total Environ* 242: 309–323.
- Beyer WN, Dalgarn J, Dudding S, French JB, Mateo R, Miesner J, et al. 2004. Zinc and lead poisoning in wild birds in the Tri-State mining district (Oklahoma, Kansas, and Missouri). *Arch Environ Contam Toxicol* 48: 108–117.
- Blas J, Baos R, Bortolotti GR, Marchant T, Hiraldo F. 2005. A multi-tier approach to identifying environmental stress in altricial nestling birds. *Funct Ecol* 19: 315–322.
- Blas J, Baos R, Bortolotti GR, Marchant TA, Hiraldo F. 2006. Age-related variation in the adrenocortical response to stress in nestling white storks (*Ciconia ciconia*) supports the developmental hypothesis. *Gen Comp Endocrinol* 148: 172–180; doi:10.1016/j.ygcen.2006.02.011 [Online 19 April 2006].
- Burger J, Gochfeld M. 1997. Age differences in metals in the blood of herring (*Larus argentatus*) and Franklin's (*Larus pipixcan*) gulls. *Arch Environ Contam Toxicol* 33: 436–440.
- Chozas P. 1983. Estudio general sobre la dinámica de población de la cigüeña *Ciconia ciconia* en España [PhD Thesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Cory-Slechta DA, McCoy L, Richfield EK. 1997. Time course and regional basis of Pb-induced changes in MK-801 binding: reversal by chronic treatment with the dopamine agonist apomorphine but not the D1 agonist SKF-28958. *J Neurochem* 68: 2012–2023.
- Cory-Slechta DA, Virgolini MB, Thiruchelvam M, Weston DD, Bouter MR. 2004. Maternal stress modulates the effects of developmental lead exposure. *Environ Health Perspect* 112: 717–730.
- Cramp S, Simmons KEL. 1980. *The Birds of the Western Palearctic*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van der Kraak G, eds. 2002. *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*. Geneva: World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. Available: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/ [accessed 17 August 2006].
- Der R, Yousef M, Fahim Z, Fahim M. 1977. Effects of lead and cadmium on adrenal and thyroid function in rats. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 17: 237–253.
- Di Giulio RT, Scanlon PF. 1985. Effects of cadmium ingestion and food restriction on energy metabolism and tissue metal concentrations in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Environ Res* 37: 433–444.
- Eeva T, Hasselquist D, Langefors A, Tummeleht L, Nikinmaa M, Ilmonen P. 2005. Pollution related effects on immune function and stress in a free-living population of pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *J Avian Biol* 36: 405–412.
- Eeva T, Lehtikoinen E, Nikinmaa M. 2003. Pollution-induced nutritional stress in birds: an experimental study of direct and indirect effects. *Ecol Appl* 13: 1242–1249.
- Ellegren H. 1996. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of nonratite birds. *Proc R Soc Lon B* 263: 1635–1641.

- Fox GA. 2001. Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes–St. Lawrence Basin. *Environ Health Perspect* 109(Suppl.6): 853–861.
- Franson J. 1996. Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl. In: *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations* (Beyer NW, Heinz GH, Redmon-Norwood AW, eds). Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 265–279.
- Green A. 2001. Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82: 1473–1483.
- Grimalt JO, Ferrer M, Macpherson E. 1999. The mine tailing accident in Aznalcóllar. *Sci Total Environ* 242: 3–11.
- Hinson JP, Raven PW. 2006. Effects of endocrine-disrupting chemicals on adrenal function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20(1): 111–120.
- Kendall RJ, Dickerson RL, Giesy JP, Suk W, eds. 1998. *Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruptors in Wildlife*. Pensacola, FL: SETAC Press.
- Kerr DS, Campbell LW, Applegate MD, Brodish A, Landfield PW. 1991. Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *J Neurosci* 11: 1316–1324.
- Kitaysky AS, Kitaikaia EV, Piatt JF, Wingfield JC. 2003. Benefits and costs of increased levels of corticosterone in seabird chicks. *Horm Behav* 43: 140–149.
- Leatherland JF. 2000. Contaminant-altered thyroid function in wildlife. In: *Environmental Endocrine Disruptors* (Guillette L, Crain DA, eds). New York: Taylor and Francis, 155–181.
- Littell RC, Stroup WW, Milliken GA, Wolfinger RD. 1996. Generalized linear mixed models. In: *SAS System for Mixed Models*. Cary, NC:SAS Institute Inc., 423–459.
- Lorenzen A, Moon TW, Kennedy SW, Fox GA. 1999. Relationships between environmental organochlorine contaminant residues, plasma corticosterone concentrations, and intermediary metabolic enzyme activities in Great Lakes herring gull embryos. *Environ Health Perspect* 107: 179–186.
- Mayne GJ, Bishop CA, Martin PA, Boermans HJ, Hunter B. 2005. Thyroid function in nestling tree swallows and eastern bluebirds exposed to non-persistent pesticides and *p,p'*-DDE in apple orchards of southern Ontario, Canada. *Ecotoxicology* 14: 381–396.
- Mayne GJ, Martin PA, Bishop CA, Boermans HJ. 2004. Stress and immune responses of nestling tree swallows (*Tachycineta bicolor*) and eastern bluebirds (*Sialis sialis*) exposed to non-persistent pesticides and *p,p'*-dichlorodiphenyldichloro-ethylene in apple orchards of southern Ontario, Canada. *Environ Toxicol Chem* 23: 2930–2940.
- McArthur MLB, Fox GA, Peakall DB, Philogène BJR. 1983. Ecological significance of behavioral and hormonal abnormalities in breeding ring doves fed an organochlorine chemical mixture. *Arch Environ Contam Toxicol* 12: 343–353.
- McNabb FMA. 2000. Thyroids. In: *Sturkie's Avian Physiology* (Whitow GC, ed). New York: Academic Press, 461–471.
- Mullner A, Linsenmair KE, Wikelski M. 2004. Exposure to ecotourism reduces survival and affects stress response in hoatzin chicks (*Opisthocomus hoazin*). *Biol Conserv* 118: 549–558.
- Norris DO. 2000. Endocrine disruptors of the stress axis in natural populations: how can we tell? *Am Zool* 40: 393–401.
- Pastor N, Baos R, López-Lázaro M, Jovani R, Tella JL, Hajji N, et al. 2004. A 4-year follow-up analysis of genotoxic damage in birds of the Doñana area (SW Spain) in the wake of the 1998 mining waste spill. *Mutagenesis* 19: 61–65.
- Refowitz RM. 1984. Thyroid function and lead: no clear relationship. *J Occup Med* 26: 579–583.
- Robins JM, Cullen MR, Connors BB, Kayne RD. 1983. Depressed thyroid indexes associated with occupational exposure to inorganic lead. *Arch Int Med* 143: 220–224.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55–89.
- SAS Institute, Inc. 2001. *SAS/STAT Guide for Personal Computers*, Version 8. Cary, NC:SAS Institute Inc.

- Scanes CG, McNabb FMA. 2003. Avian models for research in toxicology and endocrine disruption. *Avian Poul Biol Rev* 14: 21–52.
- Schantz SL, Widholm JJ. 2001. Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals. *Environ Health Perspect* 109: 1197–1206.
- Scheuhammer AM. 1987. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: a review. *Environ Poll* 46: 263–295.
- Silverin B. 1998. Territorial behaviour and hormones of pied flycatchers in optimal and sub-optimal habitats. *Anim Behav* 56: 811–818.
- Smits JE, Fernie KJ, Bortolotti GR, Marchant TA. 2002. Thyroid hormone suppression and cell-mediated immunomodulation in American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to PCBs. *Arch Environ Contam Toxicol* 43: 338–344.
- Smits JEG, Bortolotti GR, Baos R, Blas J, Hiraldo F, Xie Q. 2005. Skeletal pathology in white storks (*Ciconia ciconia*) associated with heavy metal contamination in southwestern Spain. *Toxicol Pathol* 33(4): 441–448.
- Snoeijs T, Dauwe T, Pinxten R, Darras VM, Arckens L, Eens M. 2005. The combined effect of lead exposure and high or low dietary calcium on health and immunocompetence in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Environ Poll* 134: 123–132.
- Van Eeden PH, Schoonbee HJ. 1996. Metal concentrations in liver, kidney, bone and blood of three species of birds from a metal-polluted wetland. *Water SA* 22: 351–358.
- Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, et al. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30: 71–133.
- Vyskocil A, Fiala Z, Ettlerova E, Tenjnorova I. 1990. Influence of chronic lead exposure on hormone levels in developing rats. *J Appl Toxicol* 10: 301–302.
- Wayland M, Gilchrist HG, Marchant T, Keating J, Smits JE. 2002. Immune function, stress response, and body condition in Arctic-breeding common eiders in relation to cadmium, mercury, and selenium concentrations. *Environ Res A* 90: 47–60.
- Wayland M, Smits JEG, Gilchrist HG, Marchant T, Keating J. 2003. Biomarker responses in nesting, common eiders in the Canadian Arctic in relation to tissue cadmium, mercury and selenium concentrations. *Ecotoxicology* 12: 225–237.
- Wingfield JC, Kitaysky AS. 2002. Endocrine responses to unpredictable environmental events: stress or anti-stress hormones? *Integr Comp Biol* 42: 600–609.

Acknowledgments

We thank A. Román, A. Tamayo, J. Ramírez, M.C. Quintero, J.L. Arroyo, B. Jiménez, R. Tobar, C. Alonso, C. Sánchez, R. Álvarez, R. Rodríguez, G. García, and N. Pastor for assistance during fieldwork; J.C. Núñez, J.L. Tella, and S. Cabezas for providing logistic support and access to the breeding colonies; V. Benito for analyzing metals; and R. Jovani for providing valuable comments on earlier drafts of the manuscript.

This work was supported by Empresa de Gestión Medioambiental, S.A., the European Union (i3P), and the Isabel María López Martínez Memorial Scholarship in a grant to J.B.; the Spanish Ministerio de Educación y Cultura in a postdoctoral fellowship to J.B. and a predoctoral F.P.U fellowship to R.B., and a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada grant to G.R.B. The Junta de Andalucía also provided funds to support this research.

CAPÍTULO 4



Disrupted Bone Metabolism in Contaminant-Exposed White Storks (*Ciconia ciconia*) in Southwestern Spain

Judit E. Smits¹, Gary R. Bortolotti², Raquel Baos³, Roger Jovani³, Jose L. Tella³, Walter E. Hoffmann⁴

¹ Department of Veterinary Pathology, University of Saskatchewan, 52 Campus Drive, Saskatoon, SK S7N 5B4, Canada

² Department of Biology, University of Saskatchewan, Saskatoon, 52 Campus Drive, SK S7N 5B4, Canada

³ Estación Biológica de Doñana, C.S.I.C., 41013 Sevilla, Spain

⁴ University of Illinois, College of Veterinary Medicine, Champagne-Urbana, IL, USA

ABSTRACT

In 1998, the Aznalcóllar mine tailings dyke in southwestern Spain broke, flooding the Agrio-Guadiamar river system with acid tailings up to the borders of one of the largest breeding colonies of white storks in the western Palearctic, Dehesa de Abajo. Over the following years, a high proportion of nestlings developed leg defects not seen before the spill, prompting this study. Nestlings with deformed legs had significantly lower plasma phosphorous (P) and higher Ca:P ratios than non-deformed cohorts in the first two years, but in the third year, when more, younger birds were studied, plasma P ranged from much higher to much lower in the affected colony compared with reference birds. Coefficients of variation for phosphorous were 19% and 60%, in reference and contaminated colonies, respectively. Storks from the contaminated colony were unable to control P levels and Ca:P ratios within the narrow limits necessary for normal bone development.

Key Words: Bone metabolism Skeletal deformity White stork Mine tailings spill Aznalcóllar

INTRODUCTION

In April 1998, a major ecological disaster occurred close to the UNESCO Biosphere Reserve which includes the Doñana National Park and associated nature reserve in southwestern Spain. The tailings dyke of the Aznalcóllar pyrite mine broke, flooding the Agrio-Guadamar river system with approximately 6 million m³ of acidic, metal-rich water and mud (Grimalt et al. 1999).

Within 1 km of the vast area inundated with the acidic mining wastes is one of the largest colonies of white storks (*Ciconia ciconia*) in the Western Palearctic, the Dehesa de Abajo (DdA) stork colony. Since the early 1980s, breeding performance of DdA storks has been studied by researchers at the Doñana Biological Station (CSIC) (Jovani and Tella 2004). In the years following the spill, besides increased prevalence of DNA damage (Pastor et al. 2004), leg and bill deformities were recognized in the nestling storks produced in this colony (Smits et al. 2005).

Because the spill was rich in metal sludge, there was a concern that elements such as lead, one of the most abundant metals identified in the toxic effluent (Grimalt et al. 1999), may have interfered with calcium deposition in the bone. Lead is known to affect bone strength through several pathways; through direct competition with Ca binding in the bone, and through interference with normal hormonal stimulation of osteoblasts and osteoclasts, the cells responsible for bone growth and remodelling (Pounds et al. 1991). Alternatively, lead can indirectly affect the differentiation of bone through reducing hormones required for bone formation (Berglund et al. 2000 and references therein). This would ultimately produce weakened long bones which are more readily fractured, especially in young, quickly growing, long-legged animals. In all the storks with leg deformities, the tarsometatarsi (lower leg bones) were

consistently affected (Figs. 1 and 2) (Smits et al. 2005). Intense investigation of contaminant metals in young storks with skeletal pathology showed that bone Pb levels alone were not related to limb deformities in the birds from DdA. However, when total metal and metalloid residues (including lead, zinc, strontium, tin, arsenic, copper, chromium, vanadium, titanium and aluminum) in the juvenile storks from DdA were examined, they were related to histopathological changes in the tarsometatarsal bones. Besides the microscopic changes in their bones, the deformed birds had legs which were more asymmetrical, and their plasma levels of bone alkaline phosphatase (BALP) were lower than in their age-matched cohorts which had normal legs (Smits et al. 2005).

We have shown with our previous study that the relationship between bone malformations and metal contamination occurred in a complex manner. Toxic elements were partially responsible for leg pathology in the juvenile storks, but the metals alone did not explain the deformities that developed. Unknown factors were exacerbating the physiological costs of exposure to the spill-related compounds. Although we could not prove a direct link with any particular element, something about the contaminant burden was affecting bone development. The purpose of this study



Fig. 1. Comparison of normal (bird on right) and deformed (bird on left) tarsometatarsi of nestling storks with malformations consistently occurring just distal to the tibiotarsal joint.

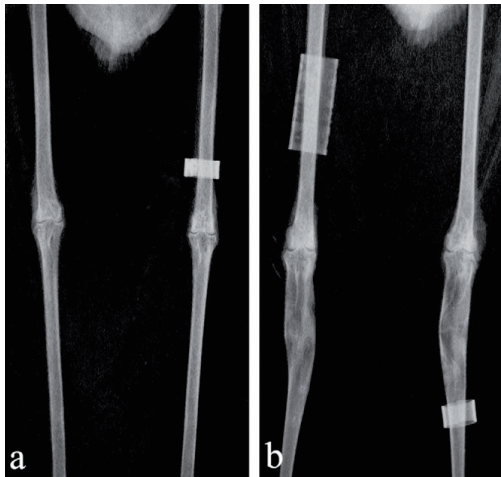


Fig. 2. Radiographs of an age-matched stork with normal legs from a distant colony (a) compared with a fledgling stork from DdA (b) with typically malformed tarsometatarsi.

was to investigate potential physiological abnormalities that could further explain the recent occurrence of defective leg development in nestling storks from the colony exposed to the mine tailings contaminants.

MATERIALS AND METHODS

Study sites

The stork colony referred to as DdA is in a natural area (Puebla del Río, province of Sevilla, 6°10'16"W: 37°12'33"N). The colony, with nests in wild olive trees, is relatively far from urban environments and within 2 km of the marshes of the Doñana area. The tailings dyke accident from the iron pyrite mine in Aznalcóllar (Sevilla), flooded the river valley and marshes up to this colony (Grimalt et al. 1999). The reference colony, Matagordas (MG), has nests in oak trees scattered over several square kms in the heart of Doñana National Park. Previous studies on metal levels in nestling white storks around Spain revealed that birds from MG have lower tissue levels of metals than most of the colonies studied, DdA included (B. Jiménez et al. unpublished). Since breeding storks generally forage near their nesting sites (Cramp and Simmons 1980) MG storks were very unlikely

to have foraged in the contaminated, tailings spill area, supporting their validity as a reference colony.

Animals

Fieldwork was conducted during May and June of 3 consecutive years beginning in 2001. In 2001, 38 nestling storks from DdA, plus 16 from the reference colony, MG, were studied. Their age ranges are presented in Table 1. In 2002, 50 deformed and non-deformed storks of different ages (Table 1) from the DdA were studied. Limited amounts of plasma allowed analysis of mineral levels in 43 of these birds (Table 1). In that year sampling was not possible at MG. In 2003, 53 nestling storks from DdA, plus 31 nestlings from MG were examined (age range and leg status in Table 1).

All nestlings from each colony were taken down from their nests, gently restrained by hand during blood collection, physical examination, weighing and measuring. Because of the bone problems observed in the DdA birds subsequent to the tailings spill (Smits et al. 2005), physical examination included evaluation for skeletal deformities involving the bill, tibiotarsus and tarsometatarsus (TMT). The birds were subjectively classified as deformed or not deformed. Affected TMT bones were consistently deformed just distal to the tarsal joint, with thickening and local malformation resulting in lateral or medial deviations of the lower leg (Smits et al. 2005). Some of the birds had bills with abnormal, dorsal curvature. Hatchling storks have mild varus cur-

Table 1. Plasma phosphorous (Mmol/L) in nestling white storks with deformed or non-deformed legs in contaminated (DdA) and reference (MG) colonies.

Year	Location	Leg status	n	Age range (days)	Phosphorous $\times \pm$ SE
2001	DdA	Deformed	15	39–58	$1.25 \pm 0.11^{A*}$
		Non-deformed	23	51–67	1.61 ± 0.09^B
	MG	Non-deformed	16	26–55	1.65 ± 0.11^B
2002	DdA	Deformed	18	27–50	1.03 ± 0.10^A
		Non-deformed	25	28–58	1.33 ± 0.07^B
2003	DdA	Deformed	7	14–45	1.47 ± 0.33^A
		Non-deformed	46	15–57	2.30 ± 0.20^B
	MG	Non-deformed	31	11–53	2.02 ± 0.07^{AB}

*Different superscript indicates significant difference $p < 0.05$ within each year.

vature of the legs for the first few weeks of life because of positioning *in ovo*. This was taken into account when very young birds were examined. After this period, their TMTs should straighten out completely, with legs increasing in length and diameter until the birds are ready to bear weight shortly before fledging which occurs between 60 and 90 days post-hatching (Bernis 1981).

Clinical pathology

Total serum alkaline phosphatase (ALP) activity is generally the sum of alkaline phosphatase derived from liver (LALP), bone, and possibly the intestines (IALP). Increased activity of BALP in serum is a marker for skeletal growth in both mammals and birds (Hoffmann and Solter 1999; Viñuela et al. 1991). Because of the specific role of BALP in bone growth and development, we determined the activity of this isoenzyme to reveal if there was a difference between storks with deformed versus normal legs. Serum activity of the ALP isoenzymes were determined using the assay previously described for rat, dog, and monkey serum (Hoffmann et al. 1994; Sanecki et al. 1993; Wiedmeyer et al. 1999). In brief, this assay measures IALP by selectively inhibiting LALP and BALP with l-tetramisole (levamisole) and determines LALP by selectively precipitating the BALP isoenzyme with wheat germ lectin. BALP is determined by subtracting LALP and IALP (if present) from the total ALP activity. Extracts of chicken liver and intestine were used to establish inhibition of LALP and IALP by the levamisole to insure that the avian ALP isoenzymes were inhibited to a similar extent as are mammalian ALP isoenzymes (Hoffmann, unpublished).

Serum calcium and phosphorous

Because of the critical role of Ca and P in bone development (Riddell and Pass 1987), levels of both minerals (mMol/L) were as-

sessed in plasma using an automated instrument (Hitachi 912 automatic analyzer, Montreal, Canada). Both the absolute and relative levels of these elements are essential for normal bone development, so the Ca:P ratio was determined as well.

Statistical analyses

Data were analyzed using SPSS (Norusis, 1993) and we considered results significant at the 0.05 level. Physiological variables in nestlings were analysed based upon the location of the colony, and/or the occurrence of deformed legs, within each year or among years.

RESULTS

The results will be presented separately for each year because not only were the environmental conditions different each year, but we did not have access to the reference colony in the National Park in 2002.

2001

In 2001, of the 38 nestlings sampled in the DdA, 23 nestlings had no clinically evident skeletal malformations, while 15 had obvious deformities of the TMT (Table 1). Although five of the birds had bill deformities, they also had deformed TMTs, so in this paper we refer only to the TMT. Sixteen nestlings were examined and sampled from the MG reference colony. Age was not a significant covariate in any of the models and was dropped. For Ca, the ANOVA of the three groups, DdA deformed, DdA non-deformed and MG reference birds, proved to be non-significant ($F_{2,51} = 1.080$, $p = 0.347$). In contrast, P levels varied with group ($F_{2,51} = 4.098$, $p = 0.022$), and LSD comparisons revealed that the P of deformed birds was significantly lower compared with both their colony mates ($p = 0.017$) and the reference birds ($p = 0.013$), but the non-deformed DdA storks did not differ from the MG reference birds ($p = 0.736$).

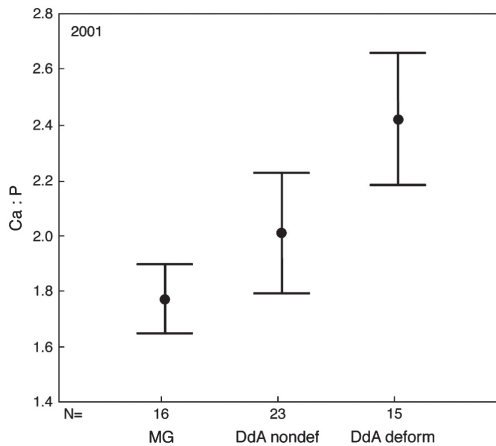


Fig. 3. Comparison of plasma Ca:P ratios among normal nestling storks from the reference Matasgordas (MG) site, and both "normal" and deformed nestlings from the Dehesa de Abajo (DdA) colony affected by a mine tailings spill in 2001.

Consistent with the findings for P, the Ca:P ratio, examined using a Mann–Whitney 2-tailed test was significantly higher in the deformed birds compared with normal birds from DdA ($z = -1.986$, $p = 0.047$) and the MG birds ($z = -2.095$, $p = 0.036$), but the normal looking birds from the 2 colonies again did not differ ($z = -0.474$, $p = 0.635$) (Fig. 3).

2002

Of 50 DdA nestlings, 28 were normal and 22 were deformed. Table 1 shows results for the 43 birds for which we had sufficient plasma. Plasma P (Table 1) was lower in deformed birds ($F_{1,40} = 4.005$, $p = 0.052$), but in contrast to results for 2001, age was a significant covariate ($F_{1,40} = 6.785$, $p = 0.013$). The age effect was the result of including 4 birds younger than any of those sampled in the previous year. When the youngest nestlings were excluded, and only nestlings within the age range studied in 2001 were used, i.e., greater than 26 d-o, the lower plasma P became even more obvious in deformed birds ($F_{1,37} = 6.916$, $p = 0.012$) and there was no longer an age effect. Again, Ca levels were not different between the 2 groups considering all ages or

the restricted age range ($ps > 0.9$). The Ca:P ratio was significantly higher in the deformed storks, whether the age range was matched with 2001 ($z = -2.359$, $p = 0.018$) or all birds were included ($z = -2.203$, $p = 0.028$).

For BALP, the results were the same regardless of whether the youngest birds were excluded, so all ages are presented here. Predictably, age was a significant covariate ($F_{1,38} = 16.760$, $p < 0.001$) because BALP increases during maturation, remodelling and mineralization of bone. Deformity as a factor in the ANOVA was also significant ($F_{1,38} = 4.398$, $p = 0.043$); however, there was a significant interaction between age and deformity ($F_{1,38} = 5.670$, $p = 0.022$). There was a steeper association between age and BALP for the deformed birds, and so in the younger age range, deformed birds had relatively lower BALP whereas for the older nestlings, deformed birds had higher BALP (Fig. 4). There were no significant correlations (all $p > 0.41$) between BALP and plasma Ca, P or Ca:P.

2003

Of the 53 nestlings from DdA only 7 had clinical deformities, so we have not based this year's analyses on deformities alone. Rather, we compared all birds from DdA to the 31

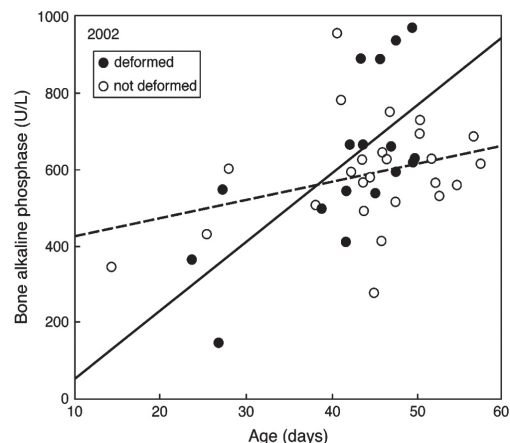


Fig. 4. In 2002, considering only storks from DdA, bone alkaline phosphatase (U/L) levels are different in nestlings with deformed and normal legs, and this difference is affected by age of the birds.

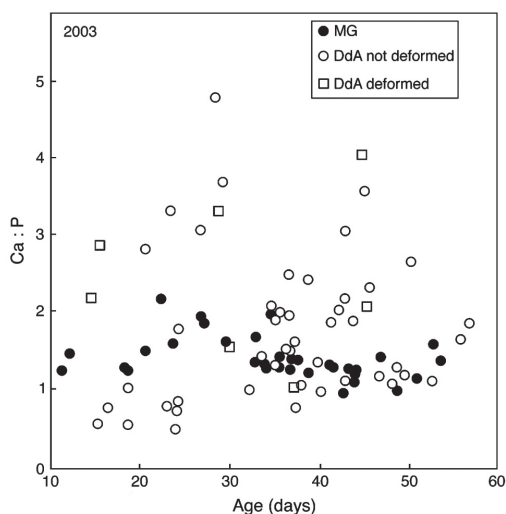


Fig. 5. In 2003, the Ca:P ratio is very tightly controlled in reference (MG) birds, whereas this control is lost in both deformed and normal looking birds from DdA.

birds from the reference colony, MG. A larger sample of younger nestlings was available than in previous years.

For plasma P, the ANOVA revealed a significant difference between colonies ($F_{1,82} = 7.840$, $p = 0.006$), age was not significant ($F_{1,82} = 1.345$, $p = 0.250$); however, there was a strong age \times colony interaction ($F_{1,82} = 7.252$, $p = 0.009$). The youngest birds at DdA had both extremely high and much lower plasma P (CV = 60%) compared with MG nestlings of matched age (CV = 19%), but the deformed birds generally had very low plasma P (Table 1, Fig. 6). For plasma Ca, age, colony, and the interaction between them, were all non-significant ($ps > 0.14$). A Mann–Whitney test showed the Ca:P ratio to be not statistically different between colonies when all ages were considered together ($z = -1.603$, $p = 0.109$). It is vital to note, however, that the MG birds maintained a narrow Ca:P range throughout their development period, while the DdA birds were not able to control this important physiological relationship (Fig. 5).

In comparing the BALP of birds, as expected age was a significant covariate ($F_{1,72} = 7.840$, $p = 0.007$), but the colonies did not differ, nor was there an age \times colony interaction

($ps > 0.2$). The lack of difference between the sites was likely explained by the decreased numbers of deformed birds in this year. When the seven deformed birds were compared to the other individuals from both colonies, the trend was for them to have lower BALP. There were no significant correlations (all $p > 0.36$) between BALP and plasma Ca, P or Ca:P for either colony.

DISCUSSION

Skeletal deformities appeared in the DdA colony in 1999, the year after the mine tailings accident, and since then, have been an ongoing problem. We recently described a complex relationship between the contaminant metals in their tissues and the limb deformities in young storks, in which both Ca and P levels in bone were affected independently by metals (Smits et al. 2005). That work took place in year 1 (2001) of a multi-year investigation. By year 3, a metabolic problem became evident in the colony that helped explain the bone malformations.

Calcium and phosphorous

Calcium and phosphorous are closely associated in vertebrate metabolism, especially in bone formation, although Ca is also essential for blood clotting, contraction of skeletal and cardiac muscle, and for regulation of cellular metabolism. Phosphorous plays essential roles in biochemical energy production, metabolism of carbohydrates and fats, is a constituent of all living cells, and helps maintain acid-base balance (Klasing and Austic 2003). An imbalance of Ca and P is a common cause of aberrant mineral metabolism which results in abnormal development of the skeleton (Fowler 1986). Young, growing chickens suffering from a deficiency of Ca, P or Vitamin D develop an abnormal skeletal condition. Their long bones develop cartilagenous proliferation near the joints with softening and bend-

ing of the bones (Klasing and Austic 2003). The TMT bones in our storks did not show changes fitting the pathology described in chickens with limb deformities, although the boney malformations were consistently at the proximal end of the TMT, just distal to, or possibly involving the proximal growth plates. In an MSc thesis by M. Prieto-Rodríguez (2001), bone pathology in grey herons (*Ardea cinerea*) was thought to be linked with poor mineralization due to dietary constraints.

There are numerous interactions among Ca, P, Vitamin D and parathyroid hormone. Both the absolute and relative concentrations, plus the balance among them are important. Despite a great deal of research, the relationships among Ca, P, diet and skeletal consequences are not clear. Even when skeletal problems are clearly described, this does not help with determining cause, and cannot be explained simple by nutrient imbalances in the diet. Levels of a particular nutrient or nutrients are optimal only when levels of all other nutrients and hormones are also optimal (Palmer 1993). As was the case with these storks, exposure to environmental contaminants would further complicate and disrupt physiological processes at many levels.

Bone growth and formation occurs by activated osteoblasts producing collagen upon which the mineral, calcium phosphate, is deposited. Remodeling is achieved through a balance between the activity of osteoclasts which degrade osseous tissue and osteoblasts which produce the scaffolding for new bone (Pines et al. 1993; Dacke 2000; Williams et al. 2004). Bone turnover during growth and remodeling is regulated by the complex interaction of numerous hormones; the activated form of vitamin D ($1,25-(OH)_2-D_3$), parathyroid hormone (PTH), calcitonin, sex steroids and growth factors. This effort is largely towards maintaining Ca homeostasis. Precursors of vitamin D in the skin are transformed into the vitamin upon exposure to ultraviolet irradiation. The kidney then ac-

tivates Vitamin D, which stimulates increased absorption of Ca and P from the gastrointestinal tract. A decrease in serum calcium stimulates PTH release from the parathyroid glands, which, in the presence of adequate vitamin D, stimulates increased mobilization of Ca from bone, increasing plasma Ca and changing its balance with plasma P (Genuth 1993).

Blood calcium was quite stable in all birds over the three years of the study, regardless of colony location or leg status. Phosphorous, on the other hand, was remarkably abnormal, with variably erratic expression over the years. In 2001, deformed chicks had much lower P than both their colony mates and the nestlings from the reference colony, which were similar to normal birds in the affected colony. The following year, the same finding emerged with P again being lower in deformed birds compared with their normal colony mates. In 2003, although there were very few deformed birds, 5 of the 7 nestlings with malformed TMTs had lower P than all their clinically normal colony mates plus the reference birds. In 2003, with a larger sample size, and younger nestlings than in previous years, it became clear that the whole DdA

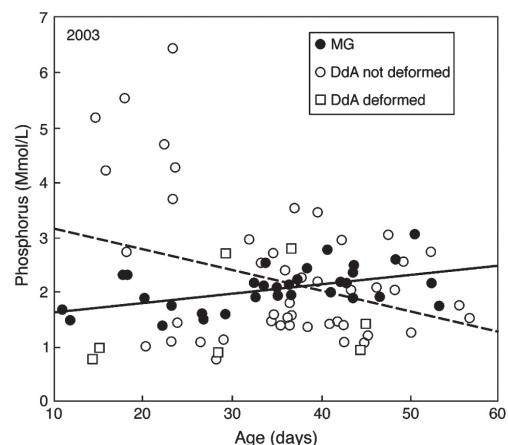


Fig. 6. In 2003, the widely different plasma phosphorous levels in nestling storks from the reference MG colony and the affected DdA colony, are especially evident in birds under 30 days old. Deformed nestlings are more likely to have very low phosphorous.

colony was suffering from abnormal P levels, and that age played an important role. DdA birds had declining P, whereas in the normal MG birds, P increased slightly with age. Most importantly, the MG birds showed normal, tightly controlled serum P throughout their nestling period, while the affected colony had P levels that were lower, to 5 times higher than the normal range. This wide range in serum P indicated that dietary restrictions were not the explanation of the P imbalance in the birds. Although it was most conspicuous in birds 25 d-o and younger, poor regulation of serum P persisted in DdA storks up to 50 d-o (Fig. 6).

Comparative Ca:P ratios over the three years

In the reference MG colony, Ca:P ratio in 2001 ranged from 1.1 to 2.5, and in 2003 it was somewhat lower, 0.9 to 2.2. In DdA, the Ca:P ratios ranged from 0.47 to 7.9 over the three years of this study. The inter-annual variation seen in the reference colony probably reflected dietary differences based upon environmental conditions. In a parallel multi-year study of the DdA stork population, condition and survival of nestlings was shown to be affected by annual variability of weather conditions (Jovani and Tella 2004). In most cases Ca:P was too high in DdA birds; 24 to 30% of all DdA birds had Ca:P ratios that exceeded the maximum seen in MG nestlings, whether they had deformities or not. Over the three years, 26%, 63% and 40% of the DdA birds had P levels below the lowest seen in the reference birds.

Although lead in the tissues of DdA storks was known to originate from the Aznalcóllar mine spill (Meharg et al. 2002), it alone, was not responsible for the subsequent bone pathology (Smits et al. 2005) (Figs. 1 and 2). The combination of metal contaminants, as well as P levels in the deformed storks that had been necropsied were implicated in the

malformations, but not in a direct and causal manner (Smits et al. 2005). There was no specific metal contaminant or group of contaminants that would explain the P problem described here.

Bone alkaline phosphatase

In the current study of storks, we identified no intestinal (I)ALP in serum, an isoenzyme routinely found in rat serum (Hoffmann et al. 1994). This lack of IALP in birds has not been reported previously, but may be inferred by the study of Tilgar et al. (2004b), as no mention is made of the IALP isoenzyme in their report using the electrophoretic technique to separate ALP isoenzymes. Bone ALP activity is elevated in serum during active bone growth in birds (Tilgar et al. 2004a,b) and mammals (Hoffmann and Solter 1999). In two species of raptors, total ALP was unpredictable in its correlation with serum Ca and P, being positively correlated in nestling red kites (*Milvus milvus*) but negatively (P) or not (Ca) correlated in black kites (*Milvus migrans*) (Viñuela et al. 1991). There was no information about BALP isoenzyme in the raptor study.

Skeletal size does not provide information regarding the stage of ossification or mineralization of bones (Tilgar et al. 2004a, and references therein). Fledglings of similar structural size may be at different stages of development. In their experimental work with free-living song birds, Tilgar et al. (2004b) made convincing arguments that lower blood BALP in mature, full-sized nestlings was because their bones were more completely ossified, relative to those of age-matched, similar sized nestlings with higher BALP. They suggest that the higher BALP is associated with active calcium deposition in the bones as they continue to mature. In kites, the total ALP reached maximum serum levels approximately two thirds of the way through their nestling period, when nestlings' legs

were nearing full size (Viñuela et al. 1991). In another context, Hoffman et al. (2000) suggested that ducklings exposed to lead acetate had decreased total ALP activity which they felt was explained by the lower bone growth in this group.

Bone alkaline phosphatase is expected to increase as the skeleton develops over the nestling period as the bones grow and remodel. Older chicks have bigger bones and, simply based upon volume of actively maturing tissue, would have higher BALP until the bones are fully mineralized. In our study, the BALP levels were different between deformed and normal birds, with the relationship changing with their age. In the younger age group, deformed birds had lower BALP, presumably because mineralization of their damaged and developing bones was delayed compared to same aged birds with normal legs. Towards the end of the nestling period, the deformed birds had higher BALP than those with normal legs. Following up on the hypothesis of Tilgar et al. (2004b), a feasible explanation would be that TMTs of the normal storks had neared completion of the ossification process, whereas the malformed birds with apparently full structural size, had higher levels of BALP because they were still actively laying down calcium phosphate to complete the maturation and strengthening of their long bones.

BALP was not correlated with Ca, P or Ca:P ratio in any year, in spite of the fact that BALP is directly related to bone growth which is heavily dependent upon Ca and P. Vitamin D deficiency, a common cause of leg problems in domestic chicks, was discounted in the storks because they live in trees in a very sunny climate, and sunlight activates Vitamin D precursors stored in skin.

In the case of the storks, we know the contaminants to which they are being exposed are interfering with optimal nutrition ei-

ther through affecting absorption of nutrients, or by causing physiological malfunctions resulting in improper mineral balance (Figs. 1, 3 and 4).

Because of the complexity of Ca and P homeostasis which depends upon normal function and interactions among the intestine, liver, kidney, parathyroid gland, thyroid gland and bone, disease in any of these organs could have a profound effect on bone physiology. Investigation of these storks did not include clinical biochemistry, so any sub-clinical problems that may have been occurring in other organ systems went undetected. Even though the leg problem is somewhat resolved by the time these birds fledge, there is reason to be concerned about their fitness and survival during the post-fledging period, a time well known for low survival rates (Naef-Daenzer et al. 2001; Ringsby et al. 1998).

The mine tailings spill was the most obvious toxicology problem related both temporally and spatially to the affected DdA colony. However, we have established that the association between this environmental disaster and the skeletal problems in nestling storks is not straightforward (Smits et al. 2005) and there are other environmental factors that may play a role. Storks do forage in garbage dumps (Tortosa and Caballero 2002), and are also likely exposed to moderately high levels of agrochemicals used in the vast and nearby (<3 km) area of rice production. It is possible that exposure to a complex mixture of metal pollutants, added to chronic, low-grade exposure to pesticides could stimulate various biotransformation and detoxification mechanisms which are contributing to the disturbance of normal regulation of phosphorous.

The current study provides solid evidence that calcium and phosphorous metabolism in the storks of DdA was defective. Because we had access to a large number of birds from a wide age range from the National Park of

Doñana we were able to obtain substantive reference data. We could, for the first time, establish a normal range for serum mineral

levels in nestling storks, which allowed us to detect the remarkable abnormalities in the DdA colony.

REFERENCES

- Berglund M, Akesson A, Bjellerup P, Vahter M. 2000. Metal-bone interactions. *Toxicol Lett* 112-113: 219–225.
- Bernis F. 1981. La población de las cigüeñas españolas. Estudios y tablas de censos, periodo 1948-1974. Universidad Complutense, Madrid, Spain.
- Cramp S, Simmons KEL. 1980. *The Birds of the Western Palearctic*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Dacke CG. 2000. The parathyroids, calcitonin and vitamin D. In: Whittow GC (Ed.), *Sturkie's Avian Physiology*. Academic Press, Toronto, pp. 473–488.
- Fowler ME. 1986. Metabolic bone disease. In: Fowler ME (Ed.), *Zoo and Wild Animal Medicine*. WB Saunders Co, Philadelphia, PA, pp. 69–90.
- Genuth SM. 1993. Endocrine regulation of calcium and phosphate metabolism. In: Berne RM, Levy MN (Eds.), *Physiology*. Mosby-Year Book, St. Louis, pp. 876–896.
- Grimalt JO, Ferrer M, Macpherson E. 1999. The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Tot Environ* 242: 3–11.
- Hoffmann WE, Solter PE. 1999. Clinical enzymology. In: Loeb WF, Quimby FW (Eds.), 2nd ed. Taylor and Francis, Philadelphia, PA, pp. 399–421.
- Hoffmann WE, Everds N, Pignatello M, Solter PF. 1994. Automated and semiautomated analysis of rate alkaline phosphatase isoenzymes. *Toxicol Pathol* 22: 633–638.
- Hoffman DJ, Heinz GH, Sileo L, Audet DJ, Campbell JK, LeCaptain LJ. 2000. Developmental toxicity of lead-contaminated sediment to Mallard ducklings. *Arch Environ Contam Toxicol* 39: 221–232.
- Jovani R, Tella JL. 2004. Age related environmental sensitivity and weather mediated nestling mortality in white storks *Ciconia ciconia*. *Ecography* 27: 1–8.
- Klasing C, Austic RE. 2003. Nutritional diseases. In: Saif YM (Ed.), *Diseases of Poultry*. Iowa State Press, Ames, Iowa, pp. 1027–1054.
- Meharg AA, Pain DJ, Ellam RM, Baos R, Olive V, Joyson A, Powell N, Green AJ, Hiraldo F. 2002. Isotopic identification of the sources of lead contamination for white storks (*Ciconia ciconia*) in a marshland ecosystem (Doñana, S.W. Spain). *Sci Tot Environ* 300: 81–86.
- Naef-Daenzer B, Widmer F, Nuber M. 2001. Differential post-fledging survival of great and coal tits in relation to their condition and fledging date. *J Anim Ecol* 70: 730–738.
- Norušis M. 1993. *The SPSS Guide to Data Analyses for SPSS/PC+*. Prentice Hall, Engelwood Cliffs, NJ.
- Palmer N. 1993. Bones and joints. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. (Eds.), *Pathology of Domestic Animals*, 4th ed., Vol. 1. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 1–181.
- Pastor N, Baos R, López-Lázaro M, Jovani R, Tella JL, Hajji N, Hiraldo F, Cortés F. 2004. A 4-year follow-up analysis of genotoxic damage in birds of the Doñana area (SW Spain) in the wake of the 1998 mining waste spill. *Mutagenesis* 19: 61–65.
- Pines M, Monsonego E, Shalom-Barak T, Halevy O, Hurwitz S. 1993. Effects of hormones and growth factors on cell proliferation and extracellular matrix synthesis by avian epiphyseal growth plate chondrocytes. In: Sharp PJ (Ed.), *Avian Endocrinology*. Burgess Science Press, Bristol, UK, pp. 249–260.
- Pounds JG, Long GJ, Rosen JF. 1991. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ Health Perspect* 91: 17–32.
- Prieto-Rodríguez M. 2001. A study of mortality and bone disease in chicks at Besthorpe grey heron (*Ardea cinerea*) colony. MSc Thesis, University of London, UK.
- Riddell C, Pass DA. 1987. The influence of dietary calcium and phosphorous on tibial dyschondroplasia in broiler chickens. *Avian Dis* 31: 771–775.
- Ringsby TH, Sæther BE, Solberg J. 1998. Factors affecting juvenile survival in House Sparrow *Passer domesticus*. *J Avian Biol* 29: 241–247.
- Sanecki RK, Hoffmann WE, Hansen R, Schaeffer DJ. 1993. Quantification of bone alkaline phosphatase in canine serum. *Vet Clin Pathol* 22: 17–23.
- Smits JE, Bortolotti GR, Baos R, Blas J, Hiraldo F, Xie Q. 2005. Skeletal pathology in White storks (*Ciconia ciconia*) associated with heavy metal contamination in southwestern Spain. *Toxicol Pathol* 33: 441–448.

- Tilgar V, Mänd R, Ots I, Mägi M, Kilgas P, Reynolds SJ. 2004a. Calcium availability affects bone growth in nestlings of free-living great tits (*Parus major*), as detected by plasma alkaline phosphatase. *J Zool Lond* 263: 269–274.
- Tilgar V, Ots I, Mänd R. 2004b. Bone alkaline phosphatase as a sensitive indicator of skeletal development in birds: a study of great tit nestlings. *Physiol Biochem Zool* 77: 530–535.
- Tortosa FS, Caballero JM. 2002. Effect of rubbish dumps on breeding success, age of first breeding and migration in the White Stork in Southern Spain. *Waterbirds* 25: 39–43.
- Viñuela J, Ferrer M, Recio F. 1991. Age related variations in plasma levels of alkaline phosphatase, calcium and inorganic phosphorus in chicks of two species of raptors. *Comp Biochem Physiol Part A* 99: 49–54.
- Wiedmeyer CE, Morton DG, Cusick PK, Wright T, Solter PF, Hoffmann WE. 1999. Semiautomated analysis of alkaline phosphatase isoenzymes in serum of normal cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet Clin Pathol* 28: 2–7.
- Williams B, Waddington D, Murray DH, Farquharson C. 2004. Bone strength during growth: influence of growth rate on cortical porosity and mineralization. *Calcif Tissue Int* 74: 236–245.

Acknowledgments

This study was possible because of the capable laboratory support of B. Trask. Many people helped in the field, especially J.M. Terrero, and J. Blas organized the radiographs of the stork legs. The Ayuntamiento de Puebla del Río provided access to the DdA stork colony. This work was supported

by Canadian NSERC grants (to JS and GB), as well as by the Spanish Ministry of Science and Technology and Feder Funds (B0S2002-00857), Telefónica Móviles S.A., and Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. RB was supported from an FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education and Culture, and an I3P grant (EGMASA S.A., European Union).

CAPÍTULO 5



Developmental Exposure to a Toxic Spill Compromises Long-Term Reproductive Performance in a Wild, Long-Lived Bird: The White Stork (*Ciconia ciconia*)

Raquel Baos¹, Roger Jovani², David Serrano¹, José L. Tella¹, Fernando Hiraldo¹

¹ Department of Conservation Biology, Estación Biológica de Doñana (CSIC), Isla de la Cartuja, Sevilla, Spain,

² Department of Evolutionary Ecology, Estación Biológica de Doñana (CSIC), Isla de la Cartuja, Sevilla, Spain

ABSTRACT

Background/Objective: Exposure to environmental contaminants may result in reduced reproductive success and long-lasting population declines in vertebrates. Emerging data from laboratory studies on model species suggest that certain life-stages, such as development, should be of special concern. However, detailed investigations of long-term consequences of developmental exposure to environmental chemicals on breeding performance are currently lacking in wild populations of long-lived vertebrates. Here, we studied how the developmental exposure to a mine spill (Aznalcóllar, SW Spain, April 1998) may affect fitness under natural conditions in a long-lived bird, the White Stork (*Ciconia ciconia*).

Methodology: The reproductive performance of individually-banded storks that were or not developmentally exposed to the spill (i.e., hatched before or after the spill) was compared when these individuals were simultaneously breeding during the seven years after the spill occurred (1999–2005).

Principal Findings: Female storks developmentally exposed to the spill experienced a premature breeding senescence compared with their non-developmentally exposed counterparts, doing so after departing from an unusually higher productivity in their early reproductive life (non-developmentally exposed females: 0.5 ± 0.33 SE fledglings/year at 3-yr old vs. 1.38 ± 0.31 SE at 6-7 yr old; developmentally exposed females: 1.5 ± 0.30 SE fledglings/year at 3-yr old vs. 0.86 ± 0.25 SE at 6-7 yr old).

Conclusions/Significance: Following life-history theory, we propose that costly sublethal effects reported in stork nestlings after low-level exposure to the spill-derived contaminants might play an important role in shaping this pattern of reproduction, with a clear potential impact on population dynamics. Overall, our study provides evidence that environmental disasters can have long-term, multigenerational consequences on wildlife, particularly when affecting developing individuals, and warns about the risk of widespread low-level contamination in realistic scenarios.

INTRODUCTION

Long-term consequences of exposure to environmental contaminants upon individual performance and wildlife population dynamics have long been a focus of research interest for several disciplines including ecotoxicology, endocrinology (endocrine disruption) and population biology [1–6]. Developmental exposure to these chemicals, even at low levels, may be particularly detrimental, with potential long-term effects on reproduction and ultimately individual fitness [7–9]. To date, empirical support for these developmental effects has come almost entirely from laboratory studies on model vertebrate species [10–13], as establishing such relationships in the wild requires long-term, individual-based population surveys which have generally been prohibitive [2,14]. Although laboratory experiments are essential for establishing possible effects on individuals exposed to specific contaminants, they usually do not represent biologically relevant exposure to ambient concentrations of complex mixtures of chemicals (but see [9]). In addition, the diversity of animals' life histories and of environmental stressors they usually have to deal with in nature, introduces the possibility of specific responses to contaminants under field conditions that may not be evident in controlled laboratory experiments [15,16].

Far from the controlled experimental conditions in laboratories, toxic spills often constitute a good example of such complex mixtures of chemicals, whose exposure threaten both ecosystems and human health. After a spill, dead animals and devastated landscapes become front-page news, and adverse short-term consequences are often relatively rapid and easy to determine [17,18]. However, once the media and general public lose interest, delayed direct and indirect long-term effects may

also occur, being even more detrimental and difficult to document [1,19]. Moreover, it is often the case that no previous studies have been conducted in the affected areas and on species of concern [20], still less that long-term monitoring of individuals has been performed. However, these data are essential to evaluating some long-term effects of the exposure to contaminants, especially of those occurring during critical life cycle stages, such as development, which may have profound impacts on fitness only detectable with longitudinal studies at individual level.

In 1998, the dyke of the Aznalcóllar iron pyrite mine (SW Spain) (Fig. 1A) broke in one of the worst environmental disasters to occur worldwide [18]. Six million cubic meters of acidic waste ran down the Guadiamar River, leaving a toxic mud tongue 40 Km long and 400 m wide up to the Doñana World Heritage Site and International Biosphere Reserve (Fig. 1B). Clean-up operations started immediately (Fig. 1C), and a few years later the affected area was apparently recovered [21]. Nonetheless, short-term monitoring on humans and wildlife reported levels of metals and metalloids that, although often below threshold toxicity values, were higher in exposed than in reference populations [18,21,22]. Moreover, sublethal effects were found in exposed animals shortly after the accident, being especially conspicuous in the White Stork (*Ciconia ciconia*), a long-lived bird nesting in the area (Fig. 2A).

Monitoring on individual life histories of white storks was carried out for more than a decade in our study area (Fig. 1A) when the spill occurred (see Materials and Methods). Before the mine accident, nearly 2,000 nestling storks born in this area had been handled for ringing and biometric measures and no malformation was recorded. However, studies performed by the same research group for several years after the spill found that around 5% of the nestlings showed conspicuous malformations

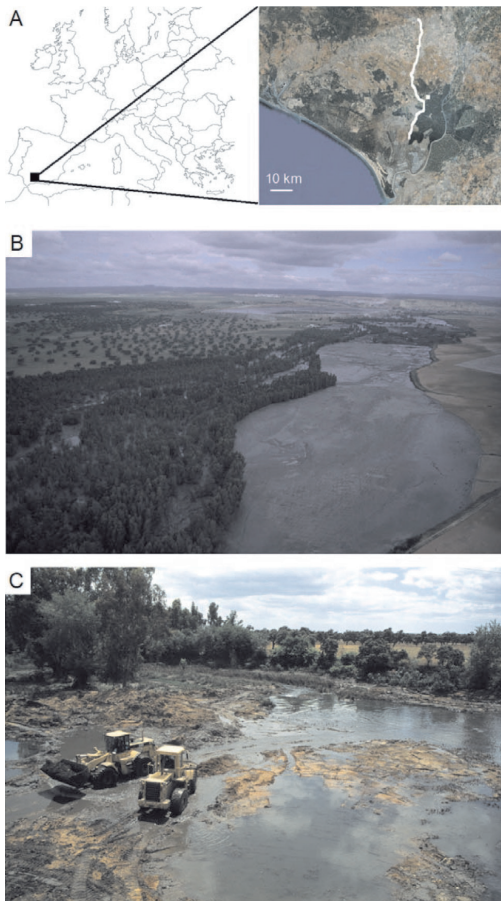


Fig. 1. The Aznalcóllar mine accident struck one of Europe's most important wetland reserves. Geographical location of the study area. The area flooded by the mine spill in 1998 is drawn in white colour. The breeding location of white storks is also indicated (square) (A). Six million cubic meters of acidic waste ran down (from North to South) the Guadiamar River, leaving a toxic mud tongue 40 Km long and 400 m wide up to the Doñana World Heritage Site and International Biosphere Reserve (B). Clean-up operations extended for more than a year removing seven million cubic meters of mud and contaminated soils (C). Pictures from panels (B) and (C) are courtesy of Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
doi:10.1371/journal.pone.0034716.g001

on bill and legs due to disrupted bone metabolism [23,24]. Additionally, high levels of DNA damage were reported among storks born after the spill compared to reference ones [25]; cellular immune response was negatively associated to Cu concentrations [26]; and low Pb levels were found to enhance nestlings' adrenal stress response

(i.e., induced production of corticosterone, the main glucocorticoid in birds) [27]. It has been reported that glucocorticoid production provoked by early-life environmental stress affects some cognition-based traits, some of which are directly related to fitness [28]. In fact, a lower probability of recruitment and long-term survival was recorded among nestling storks with higher adrenal stress response [29]. Concepts such as the special susceptibility of the developing organism to environmental stressors and early induction of latent effects are widely held within the scientific literature [30,31], with an increasing recognition of the importance of developmental conditions (e.g., nutrient deficiency) on fitness parameters [32,33]. However, as far as we know, the potential fitness consequences of the exposure to environmental chemicals during development remain completely unknown for wild, long-lived vertebrates.

Here, we provide what would be the first evidence of long-term fitness effects of low-level environmental contamination on developing individuals of long-lived species in the wild. Alternatively to the classical approach of comparing breeding parameters before and after a pollution event [34,35], we simultaneously studied the breeding performance of individuals that were or not developmentally exposed to the spill (i.e., hatched before or after the spill) during a seven-year period after the spill occurred. Thus, we minimized potential confounding environmental effects associated with the spill (e.g., decreases in food availability and/or quality) other than the developmental exposure to contaminants.

MATERIALS AND METHODS

Field procedures

Our study was conducted in the surroundings of the area directly flooded by the toxic waste in April 1998 (Fig. 1A), where there is one of

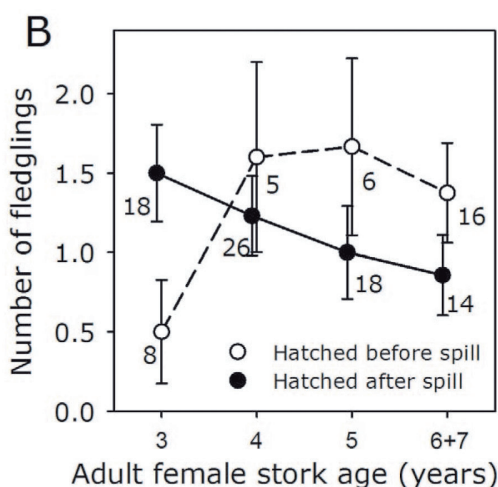


Fig. 2. Breeding performance of female white storks nesting in the spill-affected area. Banded white stork (with unique plastic-coded leg band) breeding in the affected area (A). Number of fledglings raised by female storks hatched before (non-developmentally exposed) and after (developmentally exposed) the mine spill as a function of age (B). Bars represent the mean \pm SE. Numbers correspond to individual breeding attempts. Picture by Roger Jovani.

doi:10.1371/journal.pone.0034716.g002

the largest breeding aggregations of white storks known for both the Doñana marshlands and the breeding distribution of this species [36]. More than 200 pairs have been recorded breeding on top of wild olive trees per year, which have been intensively monitored since 1981. Annual monitoring included accurate nest counts, breeding outcome, and marking of most fledglings with plastic-coded

leg bands easily readable at distance by using spotting scopes, to determine survival, recruitment, and dispersal of individuals. This long-term monitoring allowed knowing the identity and age of many adults breeding there in successive years. Further details of field protocols used in this study are presented elsewhere [29,37].

To examine developmental spill effects on storks' breeding performance, we continued to band the fledglings hatched after the spill and collected individual-based data on reproduction during seven years following the mine accident (1999–2005). White storks are quite philopatric and show a high fidelity to their breeding site [38,39], so we were able to record reproductive histories from several recruits to the study area.

We selected nests where the presence of a clutch was recorded. Storks were categorized as “non-developmentally exposed” to the spill if they had been hatched before 1998 and “developmentally exposed” if they had been hatched from 1998 onwards. We compared age-associated changes in breeding performance (clutch size and the number of fledglings produced, see [37] for details) between both groups of birds when breeding after the spill (see below). To avoid other potential factors affecting results (e.g., genetic factors, habitat characteristics, foraging areas) [34,40], we focused exclusively on storks hatched in our study area before or after the spill and breeding in the same area following the mine accident (i.e., 1999–2005).

Breeders' age and sex were determined through banding records and molecular sexing [41] and/or observations of copulatory behaviour, respectively. The full data set consisted of 111 females and 138 males. None of them presented obvious deformities when banded as nestlings. We minimized disturbance to the study subjects by following protocols in concert with Spanish laws and prioritizing ethical considerations over scientific goals.

Study design and statistical analyses

The fitness effects of contaminants on developing individuals can be confounded by other environmental effects such as a decrease in food availability and/or quality [42]. Although white storks have a surplus of food resources in the study area generated by the invasion and spread of what is currently their main prey, the North American red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [43], we opted to compare the breeding performance of storks developmentally exposed or not to the spill just in the period after the spill. By this way, instead of classical approaches that compare pre- with post-spill breeding parameters, all our study subjects (developmentally exposed or not to the spill) were breeding under the same environmental conditions. Nonetheless, environmental aspects other than food availability and/or quality (e.g., rain episodes that might reduce breeding success [44]) could also vary between years during the post-spill period. Therefore, we included in our statistical analyses the year of breeding as a random factor, to minimize the potential, confounding effects of weather or any other unmeasured environmental (year) effects on reproduction. Bird identity and year of birth were also considered as random terms to control for unmeasured sources of between-individual and between-cohort variation. Since long-lived bird species are known to improve their breeding parameters with age [45], we also decided to control for age effects on breeding performance. After all, the mine accident offered us a “natural experiment” where the “treatment” was the exposure to contaminants during individual development, measuring breeding performance of birds during similar environmental conditions after the spill, while controlling for age and potential sources of variation (individual, cohort, and year of breeding) as random effects.

Generalized Linear Mixed Models (GLMMs) with Poisson error distribution and

log link function were run using the GLIMMIX Procedure of SAS (SAS® v. 9.2). Clutch size and the number of fledglings were analyzed in relation to developmental exposure to the toxic spill (group factor with two levels: hatched before or after the spill, i.e., non-developmentally spill-exposed or developmentally spill-exposed, respectively) and age (either as linear or quadratic functions). Two-term interactions between the group factor and linear and quadratic functions of age (i.e., age \times group and age² \times group) were also included in the saturated model. Each explanatory variable was tested for statistical significance following standard backwards procedures, where non-significant ($P > 0.05$) variables and interactions were sequentially removed from the saturated model. Bird identity, breeding year and year of birth were included as random terms to control for unmeasured sources of between individual, between-year, and between-cohort variations (see [46]). Moreover, a first-order autoregressive covariance structure (AR(1)) allowed the assessment of within-individual changes with age [47]. Females and males were analyzed separately to unravel potential sex-specific effects on reproduction and avoid pseudoreplication.

The Information Theory (IT) approach for model selection (where Akaike’s Information Criterion or AIC is the most popular descriptor for selecting models) is increasingly considered superior to the classical Null Hypothesis Testing (NHT) approach and model simplification through stepwise regression (but see caveats of both approaches in [48]). We could not use AIC criteria here since the structure of our models, with random effects and non-normal distribution of errors (i.e., GLMMs), involves parameter estimation based on residual log pseudo-likelihood, while the AIC criteria use maximum likelihood, and there are warnings in the literature that AIC cannot be safely used in case of mixed models [49] (and references therein). Nonetheless, recent

reanalyses of data [50] have shown that model simplification through stepwise regression and model selection based on IT yield similar results, suggesting there is not a method consistently better than others (see also [48]). Moreover, we provide our whole data set as Table S1 in the hope that further statistical developments will allow other researchers to reanalyze it under IT or other alternative approaches.

Ethic statement

Storks returned to their nests just a few minutes after our inspection of nest content, rapidly resuming their normal breeding activities. Thus, our perturbation was supposed to be low. Moreover, we did a low number of visits each year, and we inspected nest contents from the ground with a mirror attached at the end of a long pole to minimize disturbance. The study carried out was conducted in agreement with the Environmental Agency of the Andalusian Government and the Spanish Ministry of Environment.

RESULTS AND DISCUSSION

In long-lived birds, age-related improvements in breeding performance are typically recorded during the early stages of the reproductive lifespan [45]. In storks, this predicted pattern was observed in females hatched before the spill. However, females hatched after the spill, and thus exposed during development, showed a striking decrease in breeding performance with age departing from a higher productivity than their non-developmentally exposed counterparts (Table 1, Fig. 2B). This is not only a population pattern driven by between-individual heterogeneity (e.g., selective appearance and disappearance of phenotypes) since even a stronger pattern was found in a longitudinal, within individual analysis of the females for which reproduction was monitored in multiple years [Repeat-

ed Measures, age×group (hatched before the spill): estimate ± SE = 0.896 ± 0.284; $F_{1,30} = 9.93$, $P = 0.004$]. No effect, however, was detected in males (all $P > 0.153$).

Studies monitoring populations over a period of time long enough for long-term spill impacts to be detected are scarce, especially when research requires pre-spill information [20]. Previous works conducted after oil tanker accidents reported spill-related effects on survival and short-term reproduction in wild vertebrates [1,35,51,52]. However, to the best of our knowledge, this is the first study to link a spill exposure in early life to subsequent long-term effects on reproduction, ultimately affecting individual fitness, thus potentially linking animal life-history trade-offs with the developmental exposure to environmental contaminants. Moreover, our study design (see above) and data analysis allowed us to minimize the potential confounding effects of environmental variation on breeding parameters.

Over the past decades, a growing number of laboratory experiments on endocrine disruption suggest that exposure to low levels of contaminants at early stages in vertebrate development may impair reproduction later in life [7,8,10–12,31]. Similarly, literature

Table 1. Summary of results from the GLMM explaining the number of fledglings in female storks ($n = 111$ breeding attempts).

Effect	Estimate	SE	F-value (df)	P
intercept	1.044	0.505	2.07 ^a (5)	0.093
age	−0.222	0.117	0.32 (1,49)	0.574
group	−1.444 ^b	0.863	2.80 (1,49)	0.101
age×group	0.351 ^b	0.163	4.64 (1,49)	0.036
bird	0.117 ^c	0.129		
year of birth	0.018 ^c	0.076		
year of breeding	0.049 ^c	0.078		

Number of fledglings was the response variable. Group (hatched before or after the spill) and female age were explanatory variables, and bird, year of birth (cohort) and year of breeding were treated as random effects. SE, standard error; df, degrees of freedom;

^at-Test;

^bEstimate corresponds to the group of storks hatched before the spill (the level "hatched after the spill" is aliased);

^crandom effect. The estimated effects, SE, F-values and associated probabilities are shown for those variables that significantly improved the fit of the model ($\chi^2/df = 1.06$).

doi:10.1371/journal.pone.0034716.t002

on humans and wild vertebrates has reported that adverse environmental conditions early in life (e.g., nutrient deficiency) may have long-term fitness costs [30,53], but exposure to environmental contaminants has not been studied in this regard in a natural setting. Our results show that developmental exposure to environmental contaminants might affect long-term fitness, doing so in a complex and even in a, *a priori*, paradoxical manner, since we found a higher early fecundity followed by a premature reproductive senescence in the developmentally exposed females. The observational nature of our study does not allow us to completely discount the possibility that the decrease in productivity observed after the age of 4–5 years old may also be affected by the pollutants accumulation throughout adult life. However, we performed a complementary analysis to test whether the exposure time before the breeding attempt (number of years elapsed between the spill and each breeding attempt) affected females' productivity, showing no such effect (GLMM: $F_{1,50} = 1.51$, $P = 0.224$). This supports the role of developmental exposure in the pattern described above.

Life-history theory provides a potential explanation for that pattern. Since long-lived organisms have to make a series of decisions such as when to breed for the first time, how many times to reproduce, and how to trade-off limited resources between reproduction and maintenance or growth [54], life-history theory predicts individuals should increase reproductive investment when their residual reproductive value is low ("terminal investment" hypothesis) [55–57]. In previous studies, we showed impairments in both immune- and adrenal stress-response [26,27], and disrupted bone metabolism [23,24], and that spill exposure of nestling storks was linked to DNA damage even in birds hatched four years after the spill [25,58]. We thus propose that these costly sublethal effects compro-

mising health may act as physiological cues of reduced survival prospects and future reproduction. In this way, this lowering of residual reproductive value would lead storks to invest comparatively more in early reproduction. This may explain both early higher productivity and advanced breeding senescence in birds developmentally exposed to the toxic spill, due to the combined harmful effects of the spill-derived contaminants and to the early investment in reproduction challenging future reproduction [53,59,60]. The absence of similar results when using clutch size as the dependent variable (all $P > 0.208$), suggests that egg composition and quality (e.g., antioxidants investment in eggs) [61] and/or parental effort (i.e., the amount of resources allocated to parental activities such as incubation, brooding, or feeding) [62] might be behind the observed pattern on the numbers of fledglings.

The compounds underlying such effects are difficult to determine because of the cocktail of contaminants in the mine spill [18]. Although metals and metalloids were the most abundant in the toxic sludge, organic compounds were also present [63], and all have been linked to adverse effects in humans and wildlife [3,64]. Moreover, different contaminants may function differently in nature, and additive, synergistic or antagonistic effects are common, making it more difficult to isolate the effects of single compounds or subgroups of compounds on ecological traits in field studies. Although metals are very likely to constitute a major part of the pollutant stress in the stork population, and several studies supported their role in the sublethal effects found in spill-exposed nestling [23,24,26,27,58], we cannot exclude the possibility that contaminants other than those present in the spill (e.g., dioxin and related compounds, flame retardants, etc.) have parallel effects, even though the levels of some of these compounds in the area seem to be low [65–67].

With this study, we show that the exposure to environmental contaminants during development could contribute to age-specific changes in reproductive success in the same way as other stress factors [68], playing thus a role in determining life-history trajectories. Although we cannot identify the proximate basis for these changes, previous studies point out several non-exclusive mechanisms by which sublethal effects of the spill-derived contaminants may affect female storks' reproductive performance and rates of senescence. One possibility is given by the oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS). Evolutionary theories discuss it as a key process in senescence [68]. Oxidative stress in wildlife sentinel species other than birds has been reported to be linked to the Aznalcóllar mine spill [69,70]. In storks, spill-exposed nestlings showed greater DNA damage in lymphocytes than reference birds [25], increasing with years [71], and being affected, in part, by the exposure to metals [58]. Being aware that associations between oxidative stress and life history traits are complex [72], it is difficult to determine whether the DNA damage measured in nestling storks is directly linked to the impaired later fecundity found here. However, a recent study using genetic analyses has reported that families of captive Zebra Finches (*Taeniopygia guttata*) with higher early resistance to oxidative stress (measured before the first breeding attempt) had more reproductive events during lifetime and delayed reproductive senescence [73]. Moreover, in Alpine Swifts (*Apus melba*), resistance to oxidative stress covaries with fecundity in females but not in males [74], supporting our sex-specific results. Several studies have revealed sex differences in response to stressful conditions in early life; females appear to be more sensitive to adverse developmental conditions when compared with males, exhibiting more evident long-term phenotypic effects [62] (and refer-

ences therein). In addition, there is evidence that females are more vulnerable to the impairment of neural functions in response to Pb and other stressors [75]. Given the crucial role that hormones play in controlling (neuro) development, physiology and behaviour [4,5], endocrine disruption might also be among the potential mechanisms involved in the effects we found here. Moreover, premature reproductive senescence has been experimentally reported in female rodents developmentally exposed to endocrine active substances [76].

Of special concern is that effects we report in this and previous studies were associated with low levels of environmental contaminants [26,27,58]. Low-dose exposure is particularly important because of its relevance to the levels experienced by the general human population. Several investigations have shown that some chemicals having adverse effects in wildlife are also detrimental for humans [5,7,13]. In fact, a recent study on children exposed to low Pb levels in early development has reported an impaired stress response similar to that previously reported in nestling storks also exposed to sublethal levels of this metal [77].

CONCLUSIONS

Our study adds to a growing body of literature suggesting that toxic spills have the potential to affect wildlife for much longer periods than previously assumed (see e.g., [78]). Major environmental "disasters" are usually labelled as such because of their immediate and obvious impacts. However, our present findings provide empirical evidence that there are "hidden", long-term fitness effects that also pose a threat to affected populations and ecosystems. We show that low-level environmental contamination may have long-term complex consequences on fitness of those individuals exposed during development that may not be evident in controlled laboratory experiments,

and that may even lead to misleading interpretations. For instance, the higher fecundity of animals early in their reproductive life might diminish conservation concern, despite the fact, as we have shown here, that it may be the beginning of declining breeding performance, with a clear potential impact on population dynamics.

Although our study is based on observational data, and thus the causal relationships and mechanism(s) involved are difficult to identify, we believe that the suggested scenarios offer promising avenues for further investigations. Overall, our results encourage interdisciplinary approaches to these issues, demanding greater caution in short-term as-

sessments of environmental impacts and supporting the long-claimed value of multi-generational studies using long-lived species to detect “hidden”, long-term effects of low-level environmental contamination. More generally, being aware that ambient exposure to low levels of chemicals in the form of mixtures is the rule rather than the exception [79], our study alerts that subtle harmful effects such as the ones found here may be more common among natural populations of vertebrates than has been appreciated to date. They may often go undetected or unrecognized in the absence of long-term monitoring plans, thus demanding greater efforts in this research area.

REFERENCES

1. Peterson CH, Rice SD, Short JW, Esler D, Bodkin JL, et al. 2003. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science* 302: 2082–2086.
2. Elliott JE, Harris ML. 2001/2002. An ecotoxicological assessment of chlorinated hydrocarbon effects on bald eagle populations. *Rev Toxicol* 4: 1–60.
3. Bernanke J, Köhler HR. 2009. The impact of environmental chemicals on wildlife vertebrates. *Rev Environ Contam Toxicol* 198: 1–47.
4. Wingfield JC, Mukai M. 2009. Endocrine disruption in the context of life cycles: perception and transduction of environmental cues. *Gen Comp Endocrin* 163: 92–96.
5. Norris DO, Carr JA. 2006. *Endocrine Disruption: Biological Bases for Health Effects in Wildlife and Humans*. New York: Oxford University Press.
6. Newton I. 1998. *Population Limitation in Birds*. San Diego, CA: Academic Press.
7. Colborn T, Clement C. 1992. *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection*. Princeton Scientific Pub.
8. Di Giulio RT, Tillit DE. 1999. *Reproductive and Developmental Effects of Contaminants in Oviparous Vertebrates*. Pensacola, FL: SETAC Pub.
9. Iwaniuk AN, Koperski DT, Cheng KM, Elliott JE, Smith LK, et al. 2006. The effects of environmental exposure to DDT on the brain of a songbird: changes in structures associated with mating and song. *Behav Brain Res* 173: 1–10.
10. Gore AC. 2008. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrin* 29: 358–374.
11. Quinn MJ Jr., Summitt CL, Ottinger MA. 2008. Consequences of *in ovo* exposure to *p,p'*-DDE on reproductive development and function in Japanese quail. *Horm Behav* 53: 249–253.
12. Ottinger MA, Lavoie E, Thompson N, Barton A, Whitehouse K, et al. 2008. Neuroendocrine and behavioural effects of embryonic exposure to endocrine disrupting chemicals in birds. *Brain Res Rev* 57: 376–385.
13. Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van Der Kraak G. 2002. *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors* World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. Available: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/index.html. Accessed 2012 Jan 12.
14. Henriksen EO, Wiig O, Skaare JU, Gabrielsen GW, Derocher AE. 2001. Monitoring PCBs in polar bears: lessons learned from Svalbard. *J Environ Monitor* 3: 493–498.
15. Sih A, Bell AM, Kerby JL. 2004. Two stressors are far deadlier than one. *Trends Ecol Evol* 19: 274–276.
16. Rowe CL. 2008. “The calamity of so long life”: life histories, contaminants, and potential emerging threats to long-lived vertebrates. *Bioscience* 58: 623–631.
17. Piatt JF, Lensink CJ, Butler W, Kendziorrek M, Nysewander DR. 1990. Immediate impact of the “Exxon Valdez” oil spill on marine birds. *Auk* 107: 387–397.
18. Grimalt JO, Macpherson E. 1999. The environmental impact of the mine tailing accident in Aznalcóllar (south-west Spain). *Sci Tot Environ* 242: Special Issue.
19. Guterman L. 2009. Exxon Valdez turns 20. *Science* 323: 1558–1559.
20. Paine RT, Ruesink JL, Sun A, Soulanille EL, Wonham MJ, et al. 1996. Trouble on oiled waters: lessons from the Exxon Valdez oil spill. *Annu Rev Ecol Syst* 27: 197–235.
21. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. 2003. *Ciencia y restauración del río Guadamar: Resultados del programa de investigación del Corredor Verde del Guadamar: 1998-2002*. Available: http://www.junta-deandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacionesdigitales/90513_CIENCIA_Y_RESTAURACION_DEL_RIO_GUADIAMAR/90513.htm Accessed 2012 Jan 12.
22. Gil F, Capitán-Vallvey LF, De Santiago E, Ballista J, Pla A, et al. 2006. Heavy metal concentrations in the general population of Andalusia, South of Spain: A comparison with the population within the area of influence of Aznalcóllar mine spill (SW Spain). *Sci Tot Environ* 372: 49–57.

23. Smits JEG, Bortolotti GR, Baos R, Blas J, Hiraldo F, et al. 2005. Skeletal pathology in white storks (*Ciconia ciconia*) associated with heavy metal contamination in southwestern Spain. *Toxicol Pathol* 33: 441–448.
24. Smits JEG, Bortolotti GR, Baos R, Jovani R, Tella JL, et al. 2007. Disrupted bone metabolism in contaminant-exposed white storks (*Ciconia ciconia*) in southwestern Spain. *Environ Poll* 145: 538–544.
25. Pastor N, López-Lázaro M, Tella JL, Baos R, Hiraldo F, et al. 2001. Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*) after the Doñana ecological disaster. *Mutagenesis* 16: 219–223.
26. Baos R, Jovani R, Forero MG, Tella JL, Gómez G, et al. 2006. Relationships between T-cell-mediated immune response and Pb, Zn, Cu, Cd, and As concentrations in blood of nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from Doñana (southwestern Spain) after the Aznalcóllar toxic spill. *Environ Toxicol Chem* 25: 1153–1159.
27. Baos R, Blas J, Bortolotti GR, Marchant TA, Hiraldo F. 2006. Adrenocortical response to stress and thyroid hormone status in free-living nestling white storks (*Ciconia ciconia*) exposed to heavy metal and arsenic contamination. *Environ Health Perspect* 114: 1497–1501.
28. Nowicki S, Peters S, Podos J. 1998. Song learning, early nutrition and sexual selection in songbirds. *Am Zool* 38: 179–190.
29. Blas J, Bortolotti GR, Tella JL, Baos R, Marchant TA. 2007. Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8880–8884.
30. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, et al. 2004. Developmental plasticity and human health. *Nature* 430: 419–421.
31. Hotchkiss AK. 2008. Fifteen years after "Wingspread"—Environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci* 105: 235–259.
32. Lindström J. 1999. Early development and fitness in birds and mammals. *Trends Ecol Evol* 14:343–348.
33. Metcalfe NB, Monaghan P. 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends Ecol Evol* 16: 254–260.
34. Wiens JA, Parker KR. 1995. Analyzing the effects of accidental environmental impacts: approaches and assumptions. *Ecol Appl* 5: 1069–1083.
35. Velando A, Álvarez D, Mouriño J, Arcos F, Barros A. 2005. Populations trends and reproductive success of the European shag *Phalacrocorax aristotelis* on the Iberian Peninsula following the Prestige oil spill. *J Ornithol* 146: 116–120.
36. Jovani R, Tella JL. 2007. Fractal bird nest distributions produces scale-free colony sizes. *Proc R Soc B* 274(1624): 2465–2469.
37. Jovani R, Tella JL, Blanco G, Bertellotti M. 2004. Variable inter-annual relationships between T-Cell mediated immunity and individual traits in white storks. *Ardeola* 51: 357–364.
38. Marchamalo J, Traverso JM. 1996. Dispersal and reproductive maturity of the white stork *Ciconia ciconia* in Madrid (central Spain). *Butll GCA* 13: 37–40.
39. Chernetsov N, Chromik W, Dolata PT, Profus P, Tryjanowski P, et al. 2006. Sex-related natal dispersal of white storks (*Ciconia ciconia*) in Poland: how far and where to? *Auk* 123: 1103–1109.
40. Wiens JA, Day RH, Murphy SM, Parker KR. 2004. Changing habitat and habitat use by birds after the Exxon Valdez oil spill, 1989–2001. *Ecol Appl* 14: 1806–1825.
41. Ellegren H. 1996. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc R Soc B* 263: 1635–1641.
42. Eeva T, Ryömä M, Riihimäki. 2005. Pollution-related changes in diet of two insectivorous birds. *Oecologia* 145: 629–639.
43. Tablado Z, Tella JL, Sánchez-Zapata JA, Hiraldo F. 2010. The paradox of the long-term positive effects of a North American crayfish on a European community of predators. *Conserv Biol* 24(5): 1230–1238.
44. Jovani R, Tella JL. 2004. Age-related environmental sensitivity and weather mediated nestling mortality in white storks *Ciconia ciconia*. *Ecography* 27: 611–618.
45. Forslund P, Pärt T. 1995. Age and reproduction in birds —Hypothesis and tests. *Trends Ecol Evol* 10: 374–378.
46. Blas J, Baos R, Bortolotti GR, Marchant TA, Hiraldo F. 2006. Age-related variation in the adrenocortical response to stress in nestling white

- storks (*Ciconia ciconia*) supports the developmental hypothesis. *Gen Comp Endocrin* 148: 172–180.
47. Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD. 1996. *SAS System for Mixed Models*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
48. Hegyi G, Garamszegy LZ. 2011. Using information theory as a substitute for stepwise regression in ecology and behaviour. *Behav Ecol Sociobiol* 65: 69–76.
49. Symonds MRE, Moussalli A. 2011. A brief guide to model selection, multimodel inference and model averaging in behavioural ecology using Akaike's information criterion. *Behav Ecol Sociobiol* 65: 13–21.
50. Murtaugh PA. 2009. Performance of several variable-selection methods applied to real ecological data. *Ecol Lett* 12: 1061–1068.
51. Wikelski M, Wong V, Chevalier B, Rattenborg N, Snell H. 2002. Marine iguanas die from trace oil pollution. *Nature* 417: 607–608.
52. Zuberogoitia I, Martínez JA, Iraeta A, Azkona A, Zabala J, et al. 2006. Short-term effects of the Prestige oil spill on the peregrine falcon (*Falco peregrinus*). *Mar Poll Bull* 52: 1176–1181.
53. Nussey DH, Kruuk LEB, Morris A, Clutton-Brock TH. 2007. Environmental conditions in early life influence ageing rates in a wild population of red deer. *Curr Biol* 17: R1000–R1001.
54. Stearns SC. 1992. *The Evolution of Life Histories*. New York: Oxford University Press.
55. Clutton-Brock TH. 1984. Reproductive effort and terminal investment in iteroparous animals. *Am Nat* 123: 212–229.
56. Hanssen SA. 2006. Costs of immune challenge and terminal investment in a long-lived bird. *Ecology* 87(10): 2440–2446.
57. Velando A, Drummond H, Torres R. 2006. Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis. *Proc R Soc B* 273: 1443–1448.
58. Baos R, Jovani R, Pastor N, Tella JL, Jiménez B, et al. 2006. Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ Toxicol Chem* 25: 2794–2803.
59. Harshman LG, Zera AJ. 2007. The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol Evol* 22: 80–86.
60. Reed TE, Kruuk LEB, Wanless S, Frederiksen M, Cunningham EJA, et al. 2008. Reproductive senescence in a long-lived seabird: rates of decline in late-life performance are associated with varying costs of early reproduction. *Am Nat* 171: E89–E101.
61. Møller AP, Karadas F, Mousseau TA. 2008. Antioxidants in eggs of great tits *Parus major* from Chernobyl and hatching success. *J Comp Physiol B* 208: 735–743.
62. Spencer KA, Heidinger BJ, D'Alba LB, Evans NP, Monaghan P. 2010. Then versus now: effect of developmental and current environmental condition on incubation effort in birds. *Behav Ecol* 21: 999–1004.
63. Alzaga R, Mesas A, Ortiz L, Bayona JM. 1999. Characterization of organic compounds in soil and water affected by pyrite tailing spillage. *Sci Tot Environ* 242: 167–178.
64. Sabbioni G, Jones CR. 2002. Biomonitoring of arylamines and nitroarenes. *Biomarkers* 7(5): 347–421.
65. Muñoz-Arnanz J, Blázquez E, Ábalos M, Abad E, Rivera J, et al. 2008. Dioxins and related compounds in white storks (*Ciconia ciconia*) from Doñana National Park, Southwestern Spain. *Organohalogen Comp* 70: 1562–1565.
66. Muñoz-Arnanz J, Sáez M, Aguirre JI, Hiraldo F, Baos R, et al. 2011. Predominance of BDE-209 and other higher brominated diphenyl ethers in eggs of white storks (*Ciconia ciconia*) colonies from Spain. *Environ Int* 37: 572–576.
67. Muñoz-Arnanz J, Sáez M, Hiraldo F, Baos R, Pacepavicius G, et al. 2011. Dechlorane plus and possible degradation products in white stork eggs from Spain. *Environ Int* 37: 1164–1168.
68. Monaghan P, Charmantier A, Nussey DH, Ricklefs RE. 2008. The evolutionary ecology of senescence. *Funct Ecol* 22: 371–378.
69. Bonilla-Valverde D, Ruiz-Laguna J, Muñoz A, Ballesteros J, Lorenzo F, et al. 2004. Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers. *Toxicology* 197: 123–138.
70. Romero-Ruiz A, Amezcua O, Rodríguez-Ortega MJ, Muñoz JL, Alhama J, et al. 2003. Oxidative stress biomarkers in bivalves transplanted to the Guadalquivir estuary after Aznalcóllar spill. *Environ Toxicol Chem* 22: 92–100.

71. Pastor N, Baos R, López-Lázaro M, Jovani R, Tella JL, et al. 2004. A 4 year follow-up analysis of genotoxic damage in birds of the Doñana area (south west Spain) in the wake of the 1998 mining waste spill. *Mutagenesis* 19: 61–65.
72. Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett* 12: 75–92.
73. Kim SY, Velando A, Sorci G, Alonso-Álvarez C. 2009. Genetic correlation between resistance to oxidative stress and reproductive life span in a bird species. *Evolution* 64: 852–857.
74. Bize P, Devevey G, Monaghan P, Doligez B, Christie P. 2008. Fecundity and survival in relation to resistance to oxidative stress in a free-living bird. *Ecology* 89: 2584–2593.
75. White LD, Cory-Slechta DA, Gilbert ME, Tiffany-Castiglioni E, Zawia NH, et al. 2007. New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol Appl Pharmacol* 225: 1–27.
76. Dickerson S, Gore AC. 2007. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Rev Endocr Metab Disord* 8: 143–159.
77. Gump BB, Stewart P, Reihman J, Lonky E, Davill T, et al. 2008. Low-level prenatal and postnatal blood lead exposure and adrenocortical responses to acute stress in children. *Environ Health Perspect* 116: 249–255.
78. Esler D, Trust KA, Ballachey BE, Iverson SA, Lewis TL, et al. 2010. Cytochrome P4501A biomarker indication of oil exposure in harlequin ducks up to 20 years after the Exxon Valdez oil spill. *Environ Toxicol Chem* 29: 1138–1145.
79. Segner H. 2007. Ecotoxicology-How to assess the impact of toxicants in a multifactorial environment? In Mothersill C, Mosse I, Seymour C, eds. *Multiple Stressors: A Challenge for the Future*, NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. Springer. pp 39–56.

Acknowledgments

We thank Francisco G. Vilches, Juan Manuel Terrero, M^a Carmen Quintero, Rosa Rodríguez, Equipo Seguimiento de Procesos Naturales, and Oficina de Anillamiento de la Estación Biológica de Doñana for field and technical assistance. We are also grateful to the Ayuntamiento de Puebla del Río for providing logistic support and access to the stork population. Mary Ann Ottinger, Jordi Bascompte, Eloy Revilla, Carles Vilà, Begoña Jiménez and Julio Blas provided helpful advice and comments to earlier versions of the manuscript. The study carried out was conducted in agreement with the Environmental Agency of the Andalusia Government and the Spanish Ministry of Environment.

Funding: Partial funding for this work was provided by the Junta de Andalucía and the Ministry of Science and Technology (BOS2002-00857). RB

was supported by EGMASA and CSIC in an i3P grant, and by the Ministry of Education and Culture in an FPU Pre-doctoral Fellowship. During writing, RJ has been supported by a Ramón y Cajal research contract (RYC-2009-03967) from the Ministry of Science and Innovation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Supporting Information

Table S1 Data on reproductive parameters from white storks (*Ciconia ciconia*) breeding in the study area after the Aznalcóllar mine spill (1999–2005). Bird code identifies individuals. Sex: 1 = males, 2 = females. Age in years. Group: 0 = hatched before the spill, 1 = hatched after the spill. * The exact number of eggs laid could be not determined. (DOC)

SÍNTESIS



Los resultados de esta tesis se han discutido en cada uno de los capítulos anteriores de una forma detallada, por lo que en este apartado se pretende ofrecer una visión general integrando los hallazgos más relevantes, comentando las principales limitaciones de estudio y sugiriendo posibles cuestiones/recomendaciones para futuras investigaciones.

DISCUSIÓN GENERAL

Durante los últimos años el campo de la **ecotoxicología** ha experimentado grandes **avances** desde **varios frentes**: i) en metodología analítica y técnicas instrumentales, con la detección y determinación de cantidades cada vez más pequeñas tanto de sustancias conocidas y presentes en el medio desde hace décadas (OCs, PCDDs, PCDFs), como de otras nuevas que han venido a sumarse a las anteriores y cuya identificación contribuye a ampliar el abanico de productos tóxicos en la naturaleza (PBDEs, PFOS, etc.); ii) técnicas moleculares (p.ej., nuevas tecnologías genómicas y proteómicas); iii) análisis de isótopos; iv) desarrollo de modelos (predictivos) biocinéticos, energéticos, estadísticos, etc. Sin embargo, aún son muchos los **retos pendientes**. Entre ellos, quizá uno de los más relevantes sea el de poder establecer **relaciones causa-efecto** en **condiciones ambientales** (investigación en campo), especialmente cuando lo que se estudian son poblaciones naturales y la evidencia está relacionada con aspectos fisiológicos o reproductivos mucho más sutiles, aunque no por ello menos importantes, que, por ejemplo, episodios de mortandad masiva (como los causados por pesticidas organofosforados y carbamatos, Goldstein et al. 1996; Kendall et al. 1992). Como se comentaba en secciones previas (ver *Métodos Generales. Consideraciones Metodológicas*), la extrapolación de lo observado en estudios dosis-efecto dentro del laboratorio a lo que ocurre en campo con especies y poblaciones de vida libre, que a menudo son objeto de múltiples factores de estrés tanto ambientales (o ecológicos) como toxicológicos (p.ej., mezclas de contaminantes), resulta complicada. Aislar los efectos de un vertido tóxico (en nuestro caso de metales y metaloides), o por ende de cualquier contaminante ambiental en condiciones naturales y establecer una relación causal es una ardua tarea que en la mayor parte de las ocasiones ha de fundamentarse en la acumulación de evidencias (p.ej., Ludwig et al. 1995). Para ello se puede recurrir a un **concepto pragmático de causalidad** según el cual se reconoce la existencia de una relación causal siempre que la evidencia indique que los factores en teoría causales (p.ej., contaminantes) forman parte del complejo de circunstancias que incrementa la probabilidad de que aparezca un determinado efecto, y que la disminución de uno o más de esos factores dis-

minuye la frecuencia o intensidad de ese efecto (Lilienfeld & Lilienfeld 1980). Este concepto de causalidad es bastante diferente del que se aplica en otros campos (p.ej., derecho, filosofía), pero en ocasiones, sobre todo cuando se tratan temas de conservación/prevención, es importante poder identificar los efectos sin determinar necesariamente la causa última de esos efectos, así como proporcionar una base para la acción pese a ignorar el mecanismo (Fox 1991).

La **consistencia** en las **respuestas** (p.ej., a lo largo del tiempo) es un aspecto/criterio importante para aproximarse al origen o causa última de un determinado efecto (Fox 1991). Sin embargo, en campo no es frecuente que el estudio de la relación entre el efecto o respuesta biológica (biomarcador) y la exposición a los contaminantes (a nivel individual o poblacional) supuestamente relacionados con ella se prolongue en el tiempo más allá de un año o estación reproductora, dos máxime (ver ejemplos en la literatura). Cuando se trata de este tipo de investigaciones, con una logística complicada y de coste elevado, extender en el tiempo el trabajo necesario para abordar con garantías estas cuestiones resulta difícil. Además, otros factores ambientales distintos a la exposición a contaminantes y variables entre años o períodos reproductores (p.ej., disponibilidad de alimento, factores densodependientes, etc.) pueden afectar o modular esa posible relación e impedir identificar la exposición al tóxico/s como origen de los efectos. En este sentido, los Capítulos 1 y 2 tratan secundariamente la **evolución temporal** de la relación entre dos de las respuestas biológicas utilizadas como biomarcadores en esta tesis: la respuesta inmune y el daño en el ADN, y los niveles de metales. La falta de un patrón claro en la relación entre cada uno de estos biomarcadores y la exposición a los metales en sucesivos años de muestreo (especialmente en el caso del daño genotóxico) impidió establecer una relación inequívoca entre el vertido y la respuesta inmune celular y los daños en el ADN medidos en ambas especies. Estos resultados, considerados de forma aislada apoyarían el hecho de que las conclusiones basadas en un solo año de estudio, aunque valiosas de cara a establecer una alerta temprana y, en consecuencia, promover investigaciones más detalladas en la misma línea (ver más abajo), deben también ser acogidas con cautela, sobre todo en lo que se refiere a la toma de decisiones encaminadas a la gestión del medio y de las poblaciones que lo habitan.

A la complejidad de establecer relaciones causa-efecto en la naturaleza, se suma otro **reto** estrechamente vinculado al anterior: la necesidad de un **seguimiento eco(lógico)-fisiológico previo** que proporcione **información** de referencia sobre qué constituye un **rango “normal”** de **variación** (de un determinado parámetro) en una población silvestre. Hay (aunque, afortunadamente, cada vez menos) una

ausencia generalizada de información básica sobre determinados aspectos fisiológicos y ecológicos de la vida silvestre que hace aún más difícil valorar los posibles cambios provocados en ellos por los contaminantes, o por cualquier otro factor de estrés de origen antropogénico o ambiental. Esta información o conocimiento de base es importante para determinar: i) cuáles son los niveles basales (“normales”) de, por ejemplo, hormonas, vitaminas, enzimas, parámetros inmunológicos, etc.; ii) cómo ciertos factores tales como el momento del día, del año, del ciclo reproductor, el estado de salud, la edad, el sexo, la condición física, etc., afectan a esos niveles y, en consecuencia, qué proporción de la variabilidad observada podría tener su origen en la exposición a los contaminantes. En esta tesis se carecía de este tipo de información, lo que dificultaba principalmente la interpretación de los resultados. De hecho, los primeros estudios en aves sobre daño genotóxico utilizando el denominado ensayo del cometa se realizaron para esta proyecto (Pastor et al. 2001, 2004), al igual que los que relacionan la respuesta hormonal al estrés con la exposición a metales (Baos & Blas 2008). Aunque las **comparaciones con individuos o zonas de referencia** pueden suplir en parte esta falta de información, este modo de proceder también presenta sus limitaciones, tal y como se muestra en el Capítulo 3, en el que se encontraron niveles de metales más elevados en la población de referencia que en la población objeto de estudio. De ahí también la necesidad de medir tanto la exposición como los posibles efectos de manera individual y no poblacional: las diferencias que se pueden llegar a encontrar entre poblaciones basadas en la utilización de valores medios pueden estar influenciadas por numerosos factores individuales (sexo, edad, condición física, estado nutricional, estado reproductor, etc.), ambientales o ecológicos (fenómenos meteorológicos adversos, presencia de parásitos y agentes patógenos, disponibilidad de alimentos, presencia de predadores, densidad de conespecíficos, interacciones sociales, etc.), que pueden dar lugar a asociaciones no del todo fiables e interpretaciones erróneas. Por todo ello, y en ausencia de ese marco de referencia en cuanto a condiciones basales o valores normales de las respuestas biológicas estudiadas en esta tesis, se consideraron una serie de “**host-factors**” o factores relacionados con el individuo que *a priori* podrían jugar un papel importante en la modulación de los efectos. Se han evaluado (en esta tesis o en trabajos previos relacionados con ella) principalmente tres de los factores más comunes en cuanto al individuo en sus primeros estadios de desarrollo: la edad, el sexo y la condición física. Este último tuvo cierta influencia en la relación entre algunos metales y biomarcadores estudiados (p.ej., el daño genotóxico), aunque el sentido de la respuesta varió en función del biomarcador y del metal analizado, e incluso para un mismo metal y biomarcador según el año de estudio sin que se haya encontrado una explicación consistente.

En el Capítulo 4 se muestra cómo la **edad** desempeña un papel fundamental en la alteración del metabolismo óseo detectada en los pollos de cigüeña procedentes de la Dehesa de Abajo, especialmente en lo que respecta a la relación Ca:P. En el último de los años de estudio (2003), el muestreo pudo ampliarse a pollos de edades inferiores a las de los dos años previos (por debajo de los 20 días de edad), encontrándose que eran estos, es decir, los de menor edad, los que mostraban una mayor incapacidad para regular los niveles de Ca y P, especialmente de P. Dado que la edad mínima de los pollos muestreados en los Capítulos 1, 2 y 3 fue en todos los casos superior a 20 días, cabe preguntarse si los resultados serían los mismos de haberse ampliado el rango de edades en su extremo inferior. En el caso de las especies altriciales o semialtriciales, como la cigüeña, la edad de muestreo es muy relevante, pues los individuos en desarrollo son especialmente sensibles a la exposición a tóxicos y sus potenciales efectos sobre la salud (Gochfeld 1997; Scanes & McNabb 2003). En lo que respecta a la respuesta al estrés, algunos estudios con passeriformes han encontrado un efecto significativo de la edad en el sentido de dicha respuesta tras la exposición a mercurio (Wada et al. 2009). No fue este el caso de las cigüeñas y los metales estudiados en esta tesis. Aunque, tal y como se ha mencionado anteriormente, el rango de edad muestreado en el Capítulo 3 era más estrecho que en el Capítulo 4 (donde sí se detectó la influencia de este factor), los resultados de análisis previos realizados precisamente para estudiar la variación de la respuesta adrenocortical al estrés con la edad sugerían que los pollos de cigüeña menores de 20 días tendrían escasa capacidad de responder hormonalmente ante un estrés provocado (Blas et al. 2006).

Otro de los factores que puede afectar a la exposición y/o efectos de los contaminantes es el **sexo** de los individuos. Las distintas estrategias vitales de machos y hembras (p.ej., en inversión reproductiva), fisiología y metabolismo (mecanismos de detoxificación o eliminación, movilización, etc., por ejemplo mediante la puesta en el caso de las hembras) hacen que la exposición, y sobre todo los efectos, de muchos de los contaminantes ambientales difieran entre los dos sexos (Bustnes et al. 2004; Colborn et al. 1993; Eeva et al. 2006a; Fernie et al. 2001). En esta tesis sólo se hallaron diferencias entre sexos en el Capítulo 5, que es el único donde se estudiaron individuos adultos. Las hembras de cigüeña expuestas al vertido durante su desarrollo mostraron un patrón alterado de la reproducción dependiente de la edad en comparación con sus conespecíficas nacidas antes del vertido. No se encontró este mismo efecto en el caso de los machos. Curiosamente, y aunque no se han incluido en esta tesis, los resultados de estudios preliminares llevados a cabo para determinar los posibles factores relacionados con la aparición de deformaciones en los pollos de esta especie apuntaban al sexo

como una de las posibles variables relacionadas con la presencia de estas alteraciones morfológicas (ver Tella et al. 2003, Anexo en CD). Consistentemente a lo largo del período de estudio 1999-2002, se detectaron más machos que hembras con algún tipo de deformación externa. Este hecho supondría que la probabilidad de presentar deformaciones es más elevada en los machos o, alternativamente, que las hembras se ven afectadas en mayor proporción que los machos, y mueren antes de ser detectadas (menor probabilidad de detección). Lamentablemente, no hay evidencia alguna que apoye de forma fehaciente ninguna de estas hipótesis. Estudios recientes sobre la aparición de un elevado número de individuos de varias especies de aves (fundamentalmente passeriformes) con deformaciones (principalmente en el pico) en Alaska y costa oeste de Norte América apuntan a que el llamado *avian keratin disorder* parece afectar a un número ligeramente más elevado de hembras que de machos aunque, por el momento, se desconocen las causas de esta epizootia (Handel et al. 2010).

Tal y como se menciona en el Capítulo 5, varios estudios han encontrado diferencias entre sexos en respuesta a distintos factores de estrés durante las primeras etapas de la vida, siendo las hembras las que parecen mostrarse más sensibles ante unas condiciones adversas durante el desarrollo que se traducen en efectos fenotípicos a más largo plazo (Spencer et al. 2010). Hablaríamos así de **efectos latentes** (Depledge 1994), es decir, de efectos que no se observan inmediatamente después de la exposición, sino tiempo después, siendo por tanto más difícil establecer una relación causal entre ellos. En este contexto, la exposición transitoria a un contaminante, especialmente en etapas del desarrollo cruciales para determinadas funciones cognitivas, reproductoras, etc., puede **comprometer la salud y/o eficacia biológica** de los individuos a **largo plazo** (p.ej., alterando la capacidad de los organismos para adaptarse o responder ante futuros retos ambientales), independientemente de que a corto-medio plazo no haya signos evidentes de esa merma en la capacidad funcional de los individuos (Colborn & Clement 1992; DiGiulio & Tillit 1999; Iwaniuk et al. 2006). Por otro lado, el hecho de que sea necesario dejar transcurrir el tiempo para poder estudiar y detectar los posibles efectos (latentes) de esa exposición sobre la eficacia biológica de los individuos también puede, paradójicamente, afectar negativamente a la detección de esos efectos, ya que cuanto mayor sea ese tiempo, mayor es también la probabilidad de que dichos efectos se diluyan o queden enmascarados por el “ruido” ambiental (variabilidad natural de fondo, mortalidad selectiva, etc.), siendo por ello más difícil su detección (Peterson 2003; Wiens et al. 2004). Esto, sumado a las dificultades logísticas que en sí entrañan este tipo de investigaciones (p.ej., disponer de financiación durante varios años, e incluso décadas) ha supuesto un importante obstáculo para la evaluación a largo plazo de los posibles impactos

medioambientales causados por la contaminación sobre la eficacia biológica de los individuos y la dinámica de sus poblaciones. Precisamente por esta razón, el uso de **biomarcadores** a corto y medio plazo se ha convertido en una herramienta **alternativa** útil para **evaluar** o valorar la **salud** de la **vida silvestre** en relación con la exposición a contaminantes, especialmente como señal de **alerta temprana** de potenciales **efectos** a más largo plazo sobre la **eficacia biológica** (Depledge 1994), y esto porque, pese a sus limitaciones (ver más abajo), integran múltiples factores tales como biodisponibilidad del tóxico, susceptibilidad individual, efectos de varios contaminantes, etc., capaces de influenciar la respuesta frente a la exposición a contaminantes a distintos niveles de organización biológica (bioquímico, celular, fisiológico, etc.) (p.ej., Handy et al. 2003).

Aunque el interés o preocupación última de los cambios inducidos por estrés (contaminantes u otros) se centre en los **niveles** más altos de **organización biológica** (población/comunidad/ecosistema), estos niveles son demasiado complejos en su estructura y función para resultar útiles en el desarrollo de herramientas de alerta temprana que permitan evaluar los efectos de los contaminantes. Así, la alternativa radica en la detección eficaz de las denominadas “señales de alerta” en los niveles inferiores de organización biológica; señales que más tarde puedan ser relacionadas con efectos a niveles más elevados (Moore et al. 2004). Estas señales (moleculares, celulares, fisiológicas) proporcionan biomarcadores de alerta temprana y, según los casos, pronóstico de un menor rendimiento (p.ej., reducción de la eficacia biológica), o cuanto menos de una determinada patología o merma en la salud de los individuos de manera análoga a como lo hacen los tests clínicos en medicina y veterinaria.

Por lo general, una adecuada evaluación requiere de la utilización de un **conjunto** o batería de **biomarcadores**, cuyas respuestas constituyen evidencias en las que apoyar dicha evaluación o valoración (Hagger et al. 2006; Rowe et al. 2001). El objetivo último de esta **aproximación basada** en el peso de las **evidencias** (en inglés, *weight of evidence approach*), o conjunto de biomarcadores, es poder relacionar el impacto de los contaminantes en distintos niveles jerárquicos, desde el molecular-celular-fisiológico, pasando por el individuo, hasta llegar a la población, comunidad, ecosistema (Depledge 1994). Para ello es necesario que las señales utilizadas sean ecológicamente relevantes. Además, estas aproximaciones deben ser flexibles y responder a los objetivos del estudio, realidades ecológicas y preocupaciones sociales (Moore et al. 2004). En algunos casos han pasado a formar parte de los protocolos de evaluación de riesgo (p.ej., Martín-Díaz et al. 2008) y podrían ser de utilidad para el manejo y conservación de espacios naturales y especies silvestres.

En **esta tesis**, la **identificación** de **efectos subletales** en los pollos de cigüeña y milano a **corto y medio plazo** en cuanto a daños en el ADN, respuesta inmunológica, respuesta adrenocortical al estrés, y alteraciones del metabolismo óseo entre otros, además de proporcionar información nueva sobre algunos de los rasgos o caracteres que pueden verse afectados tras la exposición a metales (y/u otro tipo de contaminantes), **alerta** en su conjunto, precisamente por la importancia de esos rasgos de cara a la eficacia biológica de los individuos, de **posibles consecuencias adversas** a más **largo plazo** sobre aspectos claves como la **reproducción** (y supervivencia) de los individuos afectados, y por ende, de un potencial impacto en la dinámica de sus poblaciones. En este sentido, el **Capítulo 5** ayuda a ilustrar la **complejidad** que puede darse en las **respuestas** (alteración del patrón de reproducción dependiente de la edad) con la posible alteración de múltiples sistemas o funciones biológicas tras la exposición a contaminantes, subrayando la importancia de considerar varios biomarcadores para evaluar esas posibles consecuencias.

Sin embargo, hasta qué punto los **biomarcadores** pueden ser utilizados o actuar como unos **indicadores** claros y ecológicamente relevantes de la **exposición y/o efectos** de los **tóxicos ambientales** es una **cuestión controvertida** (Forbes et al. 2006), sobre todo cuando se estudian de forma aislada.

Aunque, en principio, es posible distinguir entre biomarcadores de exposición y biomarcadores de efecto (aunque también hay quien habla de biomarcadores de susceptibilidad, biomarcadores de efectos latentes, etc.; ver, p.ej., Chambers et al. 2002; Depledge 1994), en la práctica, a menudo desconocemos si la respuesta de un determinado biomarcador es indicativa sólo de exposición o si también proporciona información relevante sobre los efectos (Forbes et al. 2006). En cuanto a estos, en general, es difícil determinar si la respuesta de un biomarcador es un **indicador** de **deterioro** de la **salud** del individuo o, simplemente forma parte de la **respuesta homeostática** del organismo, y significa que está respondiendo adecuada o satisfactoriamente a la exposición (Baos & Blas 2008; Calow & Forbes 1998; Depledge 1994). No obstante, aunque la mera alteración (elevación, disminución, anulación) de una determinada actividad enzimática, o de una hormona concreta tras la exposición a un tóxico no implica necesariamente que la salud, la reproducción y/o supervivencia del individuo se vean comprometidas (Lee & Anderson 2005), sí indica que esa exposición es suficiente para desencadenar una determinada respuesta bioquímica o fisiológica que podría llegar a tener consecuencias potencialmente adversas sobre la salud y la eficacia biológica de los individuos. Esa es probablemente su mayor **ventaja**, la de actuar como un sistema de **alerta temprana**. Aun así, la evaluación de la



salud ambiental basada en el uso de biomarcadores plantea una serie de **problemas o inconvenientes** tales como:

- La **complejidad** de establecer **relaciones dosis-respuesta** (p.ej., relaciones no monotónicas de varias formas; hormesis, etc.) (Calabrese 2005; Depledge et al. 1993).
- La **naturaleza transitoria** de algunas **respuestas**, sobre todo en el caso de los estudios en campo, donde se desconoce el tiempo (momento *–timing–* y duración) de exposición (Depledge 1994; Forbes et al. 2006).
- No está claro cómo en la naturaleza los **factores ambientales** (bióticos y abióticos), **modifican** la **respuesta** de los biomarcadores tras la exposición a contaminantes en comparación con la respuesta observada en condiciones controladas de laboratorio. Aunque los estudios o experimentos de laboratorio son útiles para establecer relaciones causa-efecto y determinar los mecanismos de acción, estos ambientes controlados no reflejan la diversidad genética, química y ecológica del mundo real (Depledge et al. 1993).
- Por lo general, los organismos de vida libre se hallan expuestos a **mezclas complejas** de distintos contaminantes o tipos de **contaminantes** que podrían dar lugar a respuestas diferentes de las esperadas tras la exposición a un solo tóxico. Así, determinar si la respuesta de un biomarcador (o la ausencia de ella) es el resultado de la exposición a un determinado tóxico o está influenciada por la presencia de otros contaminantes, incluso cuando esas respuestas se miden simultáneamente con los niveles ambientales de esos contaminantes o los que porta el propio organismo (tejidos), no es tarea fácil, especialmente cuando:
- La misma respuesta puede obtenerse tras la exposición a diferentes tóxicos (**inespecificidad**) y, además, resultar de muy distintos procesos con distintas consecuencias para el organismo (p.ej., inducción de proteínas de estrés, daño en el ADN, etc.) (Depledge et al. 1993). En esta tesis, los biomarcadores utilizados se caracterizan por su elevada **sensibilidad** frente a la exposición a tóxicos, pudiendo ser inducidos por niveles bajos de metales, tal y como se ha podido comprobar en los tres primeros capítulos. Sin embargo, al tiempo que por una elevada sensibilidad, estos biomarcadores también se caracterizan por su escasa especificidad, ya que la misma respuesta puede ser desencadenada por la exposición a otro tipo

de contaminantes e incluso a factores de estrés ambiental de otra naturaleza (p.ej., parásitos, competencia intra- e interespecífica, etc., Baos & Blas 2008; Fairbrother et al. 2004).

- La **medición** de algunos biomarcadores puede resultar bastante **costosa**, tanto técnica como económicamente.
- Las respuestas pueden variar en función de la especie estudiada. Las **diferencias interespecíficas** (p.ej., Capítulos 1 y 2) pueden deberse a: i) distintas estrategias vitales y aspectos relacionados (p.ej., fenología de la reproducción en relación con la exposición y biodisponibilidad del tóxico, nivel trófico, hábitos alimenticios, etc.), y/o ii) diferencias en su respuesta fisiológica a la exposición (Eeva et al. 2000, 2006b; Rainio et al. 2013). En nuestro caso, aunque ambas especies se alimentan de una gran variedad de presas y pueden ser calificadas de oportunistas, es posible que el grado de exposición varíe en función de la composición de la dieta en cada momento (Morrissey et al. 2010). Sin embargo, también es posible que su sensibilidad a los mismos tóxicos difiera (Eeva et al. 1997; Head et al. 2008; Miles et al. 2007).
- La mayoría de los estudios que utilizan biomarcadores como predictores de impactos a niveles elevados de organización biológica (a nivel de individuo o superior) se han basado hasta hace relativamente poco tiempo en **modelos estadísticos empíricos**, tales como la correlación o la regresión simple o múltiple. Con frecuencia no resulta fiable extrapolar esas correlaciones a otras situaciones, lo que limita en gran medida su utilidad. Además, los estudios correlativos carecen del poder de los tests de hipótesis y, por ello, a menudo necesitan mayor tamaño muestral. No obstante, también pueden revelar correlaciones inesperadas que sugieran hipótesis a testar.

Por todo ello, pero especialmente por la **gran cantidad de información adicional** (p.ej., factores ligados al individuo, al medio, estrategias vitales, etc.) necesaria para **interpretar** correctamente la **respuesta** de un biomarcador, hay quienes opinan que el uso de biomarcadores no es una herramienta predictiva rentable (coste-beneficio) para estimar el potencial impacto de los contaminantes a niveles elevados de organización biológica. No obstante, reconocen que pueden proporcionar una visión más clara de los mecanismos que se hallan detrás de los efectos observados tras la exposición a un tóxico, y que podrían, en determinados casos (gran especificidad), resultar útiles como indicadores de exposición, así como generar hipótesis testables en experimentos controlados al detalle (Forbes et al. 2006).

Es cierto que son muy pocos los **biomarcadores** para los que la **relación** entre su respuesta y la **eficacia biológica** de los individuos se ha determinado inequívocamente (Cheek 2006; Ellegren et al. 1997; Matthiessen & Gibbs 1998). La literatura contiene numerosos ejemplos en los que las respuestas de los biomarcadores (bioquímicas, fisiológicas, etc.) se detectan a niveles de exposición para los cuales la disminución de supervivencia, crecimiento y reproducción son evidentes (Huggert et al. 2002; McCarthy & Shugart 1990). En esos casos, los biomarcadores proporcionan poco valor añadido como alerta temprana del impacto de la exposición a contaminantes sobre la eficacia biológica de los individuos, así como de los potenciales efectos subsiguientes sobre poblaciones y ecosistemas. No obstante, continúa siendo una información muy valiosa, ya que en numerosas ocasiones resulta más fácil tomar una muestra para evaluar la respuesta de un determinado biomarcador que realizar un seguimiento pormenorizado de la reproducción y supervivencia del individuo o de la población.

En **esta tesis** se ha encontrado que las respuestas de los biomarcadores estudiados se relacionan, en mayor o menor medida, con niveles bajos de metales, es decir, con niveles a los que probablemente no se detectarían efectos a corto plazo sobre la reproducción y/o supervivencia pero que, sin embargo, se demuestran posteriormente, a más largo plazo, relacionados con la reproducción (alterada) de los individuos expuestos al vertido durante el desarrollo. Por tanto, en este caso particular, sí podemos afirmar que los **biomarcadores** utilizados actuaron como **señal de alerta temprana de ulteriores efectos** sobre la **fitness** o **eficacia biológica** de los **individuos** (cigüeñas) **expuestos al vertido** de Aznalcóllar, o al menos de aquellos que lo estuvieron en las etapas más tempranas de su **desarrollo**.

Sin embargo, también es necesario mencionar que, dada la escasa especificidad de los biomarcadores aquí empleados y la naturaleza observacional de los estudios realizados, cabe la posibilidad de que las respuestas obtenidas indiquen perturbaciones no relacionadas con la contaminación (del vertido u otro tipo). Aun así, en este y otros casos, estos biomarcadores que podríamos llamar generalistas, cumplirían su función: indicar la existencia de algún/os factor/es de estrés, por lo que su utilidad para la gestión medioambiental y la conservación, sigue siendo clara, permitiendo detectar un problema (p.ej., futuros efectos sobre la reproducción) y señalando la necesidad de investigaciones futuras (Handy et al. 2003). En **resumen**, la obtención de respuestas a corto-medio plazo mediante el uso de biomarcadores sirve para avalar la necesidad de llevar a cabo, o en su caso continuar, un seguimiento y estudio a largo plazo de esas mismas respuestas y de sus posibles consecuencias sobre la reproducción y supervivencia de los individuos y, por tanto, de su potencial impacto sobre la dinámica de las poblaciones afectadas.



Estudios complementarios

Aunque no se incluyan como capítulos de esta tesis, a lo largo de todos estos años de investigación también se llevaron a cabo otros estudios para los que se tomaron muestras y realizaron análisis de diversa índole (histopatológicos, virológicos, de exposición a pesticidas organoclorados y otros, inmunológicos, etc.). Sus resultados (en informes y publicaciones como: Baos et al. 2002; Gómara et al. 2008; Muñoz-Arnanz et al. 2011ab; Smits et al. 2005, ver **Anexo** en CD) también aportaron información y contribuyeron a definir líneas de investigación y a concretar actuaciones, en ocasiones limitadas por cuestiones logísticas. A continuación se exponen brevemente algunos de estos estudios.

Aproximación experimental con microalgas

Quizá uno de los aspectos más retadores respecto a nuestra capacidad para evaluar los efectos de los metales (y, por ende, de otros contaminantes) en los seres vivos sean las mezclas, porque las combinaciones de elementos que pueden darse en la naturaleza son casi infinitas, y porque esos efectos pueden verse influenciados por procesos biológicos, físico-químicos, etc. (Peakall & Burger 2003). Aunque es posible concebir experimentos controlados para examinar los efectos de dos metales en el laboratorio, la combinación de tres o más elementos se convierte en ciertamente problemática, sobre todo dadas las posibles variaciones en las concentraciones. En el caso del vertido de Aznalcóllar, teniendo en cuenta la importancia del daño causado en el ADN y su potencial impacto sobre la *fitness* o eficacia biológica de los individuos (Ellegren et al. 1997), se decidió plantear un experimento para calcular tasas de mutación en organismos expuestos al cóctel de metales (y otros posibles contaminantes) que representaba el vertido. Para ello se utilizó como modelo experimental la microalga *Scenedesmus intermedius*. Los resultados de los experimentos realizados mostraron que la *fitness* disminuyó progresivamente conforme aumentaba la concentración de lodos/suelo contaminado en una relación dosis-dependiente (Baos et al. 2002). Independientemente de los resultados obtenidos en cuanto a tasas de mutación y capacidad adaptativa de este tipo de organismos a episodios de contaminación como el que nos ocupa (ver detalles en Baos et al. 2002), la complejidad del diseño experimental cuando se pretendió descomponer el vertido en los metales que contenía y testar distintas concentraciones y combinaciones hizo abandonar el intento de explorar experimentalmente cuáles serían los posibles efectos genotóxicos y mutagénicos de estos metales y sus potenciales interacciones, tanto en el caso de las microalgas como en el de las aves.

Deformaciones en pollos de cigüeña

Aunque parece claro que detrás de las deformaciones observadas, sobre todo de las que afectan a las extremidades posteriores (tarso-metatarso), se halla un metabolismo óseo alterado (Capítulo 4), con escasa o nula capacidad de regulación de la *ratio* Ca:P (especialmente acusada en los pollos de menor edad), la causa de esta alteración o disrupción metabólica, así como la de otros parámetros bioquímicos e histopatológicos relacionados con el metabolismo óseo (Smits et al. 2005) sigue siendo, en última instancia, desconocida. Basándonos en el concepto pragmático de causalidad al que se hacía referencia al principio de la *Discusión General*, la exposición al vertido es la hipótesis más plausible: las primeras deformaciones en las cigüeñas de la Dehesa de Abajo se detectaron en 1999 durante el anillamiento de los pollos nacidos ese año en el núcleo reproductor; nunca antes se habían encontrado este tipo de alteraciones morfológicas a pesar de ser este (anillamiento) un procedimiento habitual que forma parte del seguimiento de la población desde los años ochenta. Las personas encargadas de anillar, medir y pesar a los pollos han sido las mismas antes y después del vertido, lo que eliminaría o minimizaría el posible sesgo del observador. Esta correlación temporal suma una evidencia más a la hipótesis de trabajo según la cual la exposición a los metales vertidos tras el accidente minero estaría relacionada con los efectos subletales observados en los pollos de cigüeña y milano estudiados en esta tesis (ver, no obstante, Fox 1991). En esta misma línea, la asociación positiva encontrada entre el Pb y la respuesta al estrés por un lado (Capítulo 3) y, por otro lado, los resultados obtenidos mediante análisis de isótopos de este metal mostrando que el Pb medido en la sangre de los pollos de cigüeña de la Dehesa procedía del vertido de la mina de Aznalcóllar (Meharg et al. 2002), constituyen un vínculo indirecto entre el accidente minero y este efecto en concreto, sumándose así a la lista de evidencias que señalan al vertido como responsable, al menos en parte, de los efectos subletales detectados en las especies estudiadas.

No obstante, no podemos obviar que muchos otros factores pueden ser igualmente responsables de estas alteraciones, o cuanto menos contribuir, junto con la exposición al vertido, a ellas. Así, por ejemplo, en todos y cada uno de los capítulos que forman esta tesis se ha discutido la posibilidad de que otros contaminantes, presentes en el vertido (p.ej., aminas aromáticas) o en el medio, anterior o posteriormente al vertido (pesticidas organohalogenados como DDT y sus metabolitos derivados, PCBs, dioxinas y furanos, etc., vinculados en mayor o menor medida a la actividad agrícola e industrial de zonas próximas) hayan desempeñado algún papel en los efectos detectados en cigüeñas y milanos. Dada la naturaleza observacional de estos estudios y la falta de especificidad de los biomarcadores utiliza-

dos, ciertamente no se puede descartar que esto no haya ocurrido, y que parte de las respuestas encontradas se deban a la exposición a estos otros contaminantes, aislada o conjuntamente (interacciones) a la de los metales presentes en el vertido. Aunque se han llevado a cabo estudios para determinar el grado de exposición de estas y otras especies (p.ej., milano real *Milvus milvus*, Gómara et al. 2008) a pesticidas organoclorados (DDTs) y otros contaminantes persistentes como PCBs y dioxinas, así como los de más reciente utilización PBDEs y DP (Jiménez et al. 2000; Muñoz-Arnanz et al. 2011ab), su posible relación con la respuesta de los biomarcadores utilizados en esta tesis no ha sido por ahora estudiada. Aun así, los niveles no parecen demasiado elevados (excepto en el caso del milano real, Gómara et al. 2008), sobre todo en comparación con los hallados en individuos de las mismas especies muestreados en otras zonas (Muñoz-Arnanz et al. 2011ab; ver, no obstante, el apartado *Recomendaciones para Futuras Investigaciones*), pero tampoco se puede descartar que, al igual que ocurre con los metales, aun siendo bajos, esos niveles sean capaces de inducir efectos subletales a corto, medio y/o largo plazo, especialmente en combinación con los metales del vertido y/u otros factores de estrés ambientales, de origen antropogénico o no.

Respuesta inmune humoral en cigüeñas

Además de la respuesta inmune celular estimada mediante el test de la fitohemaglutinina (Capítulo 1), se llevaron a cabo estudios para determinar la posible relación de los metales presentes en el vertido con la respuesta humoral mediada por linfocitos B mediante la inyección intraperitonealmente de células sanguíneas de cordero (en inglés *sheep red blood cells*, SRBC), un antígeno habitualmente utilizado para estimar este tipo de respuesta en aves. Dada la insensibilidad de los pollos de distintas especies de aves para responder a este antígeno, también se utilizó el *dinitrophenol-keyhole limpet hemocyanin* (DNP-KLH) (suministrado subcutánea e intramuscularmente) para tal fin (Smits & Baos 2005). En general, y por lo que respecta a la relación con los metales medidos en los mismos individuos para los que se estimó la producción de anticuerpos ($n = 31$), se encontró una asociación negativa entre el Cu y la respuesta al DNP-KLH (GLM mixto con *distribución normal* y *función de enlace identidad*: $F_{1,10} = 18.05$, $p = 0.002$), antígeno de los dos utilizados que mostró una mayor efectividad (estimada como el porcentaje de individuos que respondieron ante la dosis de recuerdo: 100% para DNP-KLH vs. 61% en el caso de SRBC). Este resultado coincide con el encontrado respecto a la respuesta inmune celular para este mismo metal (ver detalles en Anexo: informe *Estrés Ambiental en Poblaciones de Aves Silvestres. Sistema Inmune y Conservación*). Aunque los metales pueden actuar como inmunotóxicos,

y algunos de ellos como el Pb, el Cd o el As, provocan efectos sobre el sistema inmune a dosis muy bajas (Exon 1984), no se ha encontrado en la bibliografía referencia alguna acerca de un comportamiento similar por parte del Cu, como ya se menciona en la discusión del Capítulo 1. Las aves muestran una alta tolerancia a este metal, que actúa como micronutriente en los organismos vivos. Además, los niveles medidos se encuentran dentro del rango normal para otras especies. No obstante, la consistencia de los resultados en los dos tipos de respuesta hace más plausible la afección del sistema inmune en los pollos de cigüeña por la exposición al vertido, y proporciona una evidencia más sobre los efectos subletales experimentados por los individuos expuestos a los lodos tóxicos. Por último, y aunque la efectividad del otro de los antígenos utilizados para estimar la respuesta inmune celular (SRBC) fue menor que la del ya comentado DNP-KLH, también en este caso se encontró una respuesta negativa frente a la exposición a uno de los metales mayoritarios en el vertido, el Pb (*GLM* mixto con *distribución normal* y *función de enlace identidad*; $F_{1,10} = 7.82$, $p = 0.02$). La exposición crónica a niveles bajos de Pb se ha asociado a una peor respuesta inmune tanto en mamíferos (Exon 1984), como en aves (Trust et al. 1990). Experimentos llevados a cabo con aves acuáticas demostraron que la exposición a este metal afectaba a la producción de anticuerpos tras la inyección de SRBC (Trust et al. 1990). Sin embargo, la concentración de Pb en los individuos que presentaban este tipo de respuesta era mucho más elevada que los niveles medidos en los pollos de cigüeña objeto de estudio. En casos de plumbismo en aves acuáticas, las concentraciones de Pb en sangre asociadas con efectos subletales en individuos muestreados en campo tienden a ser más bajas que en los de estudios experimentales en laboratorio (Franson & Pain 2011).

CONSIDERACIONES FINALES

En el pasado, el **daño al medio ambiente** por causa de la contaminación se ha identificado mayoritariamente de forma retrospectiva (p.ej., en zonas altamente industrializadas como los Grandes Lagos de Norteamérica) o en respuesta a episodios agudos de exposición como los desastres causados por accidentes industriales (Seveso, Bhopal, Chernobyl, Fukushima, etc.) o vertidos tóxicos [de petróleo (Exxon Valdez, Prestige, Deepwater Horizon-BP, etc.), u otros (Aznaicóllar, Kolontár-Hungría, etc.)]. En general, estos desastres se han medido o valorado en términos de **impacto** sobre la salud humana o de cambios perceptibles en el medio tras la pérdida de determinadas poblaciones o comunidades, generalmente a **corto o medio plazo**. Sin embargo, la **exposición crónica**, a más **largo plazo**,

al **estrés** ambiental provocado por la contaminación que resulta de tales desastres (incluso tras la limpieza de las zonas afectadas) u otros impactos relacionados, rara vez se traduce en cambios rápidos y catastróficos. Por el contrario, los **cambios** o efectos suelen aparecer de forma gradual, sutil, y por ello su impacto es difícil de detectar entre los procesos que acontecen en el medio de forma natural (Guterman 2010; Peterson et al. 2003). Además, la **escala temporal** en la que suceden estos cambios es a menudo del orden de **décadas**, lo que los hace menos proclives al estudio. Este último aspecto ha sido históricamente un importante **obstáculo** en la **detección** de efectos a largo plazo de la exposición a contaminantes.

El **accidente** de la **mina** de **Aznalcóllar** propició la realización de una serie de **estudios** en el Espacio Natural Doñana que se prolongaron en el tiempo durante **más de siete años**, dando lugar, entre otros, a esta tesis. En ella se han utilizado distintas aproximaciones para investigar la **salud** de la **avifauna** y el posible papel de los contaminantes vertidos tras el accidente (principalmente metales) en su potencial deterioro. Entre los objetivos planteados estaba que los resultados de estas investigaciones pudieran después ser utilizados para aportar soluciones o respuestas a los posibles problemas derivados de esa contaminación, y por extensión a los de otros accidentes o desastres similares. Persiguiendo tales objetivos se aprendieron algunas **lecciones** que se mencionan a continuación, al tiempo que surgían **nuevos retos** y **cuestiones** que también se comentarán en los párrafos siguientes.

Aunque los niveles de **metales** encontrados en cigüeñas y milanos se hallaron, en la mayoría de los casos, por debajo de los umbrales de toxicidad citados en la literatura como susceptibles de causar efectos subletales, la **mezcla** de todos ellos en el vertido, junto a contaminantes de distinta naturaleza como pesticidas organoclorados, PCBs, dioxinas y derivados, aminas aromáticas, etc., también presentes en el medio (Alzaga et al. 1999; Gómara et al. 2008; Jiménez et al. 2000; Muñoz-Arnanz et al. 2011ab), podría haber jugado un papel importante en los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores. La naturaleza observacional de las investigaciones realizadas junto con la **ausencia** de **estudios experimentales** diseñados al efecto en condiciones controladas (laboratorio) que apoyen los resultados obtenidos en campo, impiden que se puedan establecer inequívocamente relaciones causales, así como determinar los mecanismos próximos asociados a tales efectos (p.ej., Rauschenberger et al. 2007). Esta es una de las limitaciones más importantes que presenta esta tesis y que resulta ineludible al tratarse de un trabajo eminentemente de campo. Por otro lado, ninguno de los **biomarcadores**

utilizados para estimar el estado de salud de las cigüeñas (y milanos) había sido estudiado con anterioridad en las aves de Doñana y, por tanto, no es posible afirmar con rotundidad que esos mismos efectos no existieran **antes** del **vertido** (exceptuando las deformaciones, Smits et al. 2005); dejando a un lado la complejidad de establecer relaciones causa-efecto en la naturaleza, parece clara la **necesidad** de un **seguimiento ecofisiológico** de **base** que proporcione cierto conocimiento sobre qué es “normal” en una población silvestre para después poder valorar las posibles desviaciones de esa normalidad y establecer sus causas.

Categorizando los biomarcadores o respuestas biológicas indicativas de exposición y/o efecto en base al nivel de organización biológica en el que son medidos, es un hecho comúnmente aceptado que los **efectos** en un **nivel bajo** de **organización biológica** (molecular o bioquímico) pueden **trasladarse** o traducirse en efectos a **niveles** más **elevados** (individuo, población). Los biomarcadores en niveles inferiores de organización biológica actuarían en este supuesto como un sistema de **alerta temprana**, útil para estimar (e intentar evitar, en la medida de lo posible) efectos adversos a niveles más elevados (ver párrafos anteriores). No obstante, esta **relación** ha sido difícil de establecer en el pasado y continua siendo un gran **reto** en el presente. **Esta tesis** constituye una **aproximación de campo** a ese gran reto. Comenzando por los niveles más bajos, se han estudiado efectos moleculares (daños en el ADN), fisiológicos (respuesta inmune, respuesta adrenocortical al estrés y metabolismo óseo), y de eficacia biológica individual (reproducción). Aunque no se han estudiado efectos a nivel de población, es presumible que los efectos detectados en cuanto a la reproducción de las hembras de cigüeña nacidas después del vertido y sus consecuencias sobre la eficacia biológica de estos individuos afecten a la dinámica de la población. No obstante, esta es sólo una hipótesis que debería ser estudiada en profundidad antes de obtener conclusiones definitivas al respecto.

Aunque un objetivo fundamental de esta tesis ha sido evaluar el impacto del vertido de Aznalcóllar en general, y de los metales en particular, sobre la salud de las aves de Doñana y su entorno, también se ha considerado necesario estudiar cuáles y cómo son las **respuestas** de los **vertebrados** de **larga vida** frente a la exposición a una fuente de estrés relativamente reciente desde un punto de vista evolutivo como es la **contaminación** ambiental; cómo puede afectar a los compromisos (**trade-offs**) establecidos entre los distintos caracteres que definen la estrategia vital seleccionada por individuos/especies para **maximizar** su **eficacia biológica**.

La mayor parte de los impactos ocasionados por **contaminantes** han tenido lugar en los últimos 150 años, y en el caso particular de algunos pesticidas (organoclorados, organofosforados, etc.) principalmente en los últimos 50 ó 60; para

los cosméticos, productos farmacéuticos y los de más reciente síntesis como los retardantes de llama, ese intervalo de tiempo es aún menor. Se trata, por tanto, de **nuevas presiones selectivas** en la **ecología de poblaciones** que afectan a todos los organismos vivos, pero que en las especies de vida larga, dada su complejidad estructural y funcional, además de sus largos tiempos de generación, permanecen bastante inexploradas. De ahí que, secundariamente, y pese a las limitaciones evidenciadas en la aproximación experimental con microalgas (Baos et al. 2002), existiera también un cierto interés por estudiar la evolución de las posibles adaptaciones individuales a ambientes contaminados. Lejos de poder establecer paralelismos entre los resultados obtenidos experimentalmente con las microalgas y de forma observacional con las cigüeñas, quizá cabría destacar que en ambos casos la **eficacia biológica** o *fitness* se ha visto **comprometida** por la **exposición al vertido**. Su estudio, sobre todo en el caso de las cigüeñas, proporciona nuevos conocimientos sobre la variación individual en cuanto a sensibilidad y respuesta a los contaminantes, especialmente a largo plazo y tras la exposición durante una etapa crítica de la vida como es el **desarrollo**. El vertido proporcionó el marco adecuado para poder realizar esta investigación. En este sentido, merece la pena señalar que aunque los **desastres medioambientales**, y sus adversas consecuencias a corto, medio y largo plazo para la fauna y ecosistemas afectados, representen siempre una amenaza para la salud y conservación de la vida silvestre (y dado que, lamentablemente, se van a seguir produciendo como un efecto colateral de la sociedad industrial y tecnológica en la que vivimos), sería recomendable que parte de la **financiación** destinada a estudiar su más que probable impacto sobre los ecosistemas afectados y paliar sus consecuencias, se utilice también para desarrollar **estudios** que puedan ayudar a responder **cuestiones evolutivas/ecológicas** aún **por resolver**.

Por otro lado, los hallazgos de esta tesis, junto con los de cada vez más investigadores en este mismo campo, pueden contribuir a que se produzcan cambios en el **modo en que se entiende la toxicidad** y los potenciales efectos de los contaminantes sobre la salud de individuos y poblaciones. Un producto químico no tiene que ser necesariamente letal para considerarse perjudicial o dañino para la salud; puede serlo por medio de efectos más sutiles dentro del organismo, por ejemplo, alterando el sistema hormonal o las defensas (sistema inmune) frente a parásitos o enfermedades y/o provocando efectos a más largo plazo sobre la reproducción. Gracias a los estudios realizados a lo largo de las últimas décadas sobre los efectos de los llamados disruptores endocrinos (p.ej., pesticidas organoclorados, PCBs, etc.), ahora sabemos que **pequeños cambios**, a veces sutiles, combinados entre sí y/o bajo condiciones diferentes y/o en generaciones posterior-

res, pueden reducir o **limitar** la **capacidad** de los organismos para **adaptarse** a nuevas situaciones o factores de estrés ambiental (Damstra et al. 2002; Depledge 1994; Goodhead & Tyler 2009). En este mismo sentido, cabe la posibilidad de que un determinado efecto sólo se haga evidente en presencia de un factor de estrés adicional (Norris 2000). La **resiliencia** de las poblaciones silvestres frente a la exposición crónica a una determinada fuente de estrés (p.ej., la exposición a contaminantes u otras perturbaciones antropogénicas o ambientales) puede **reducirse** o **desaparecer** con la exposición a un **nuevo** factor de **estrés** dando lugar a **efectos inesperados** (Woodward et al. 2011 y referencias allí citadas). Este podría ser el caso del vertido de Aznalcóllar, sobre todo en relación con el más conspicuo de los efectos detectados: las deformaciones en los pollos de cigüeña. El hecho de que estas deformaciones se detectaran sólo después del accidente minero, y que los resultados encontrados en relación con el metabolismo óseo mostraran que, independientemente de que las deformaciones fueran o no evidentes, todos los pollos muestreados en la Dehesa de Abajo presentaran alteraciones de los parámetros bioquímicos estudiados, hace pensar que el problema, siendo complejo en cuanto a sus causas, e involucrando a varios factores (Smits et al. 2005), tiene en el vertido un probable detonante o catalizador de esos efectos tras superarse la resiliencia de los individuos afectados (Gangoso et al. 2009). Aunque la información de que se dispone es insuficiente para demostrar de forma inequívoca esta hipótesis, las evidencias acumuladas en esta tesis apuntan en esa dirección.

Esta tesis y los **trabajos** que paralelamente se han realizado (ver Anexo en CD; Consejería Medio Ambiente-Junta de Andalucía 2003) y **publicado** en cuanto a **niveles de metales en sangre** (y/o efectos relacionados) contribuyen a **llenar el vacío de conocimientos** con el que nos encontramos al principio de esta investigación (niveles de referencia), aportando información nueva de distintas especies en un escenario de contaminación conocido (p.ej., Benito et al. 1999) y **relacionando**, para algunas de estas especies, **exposición** (concentración de metales) **con efectos** a distintos niveles de organización biológica. Respecto a esto último, los artículos que forman esta tesis se suman a la literatura ya existente sobre los efectos de los contaminantes en fauna silvestre, y la **amplían** en cuanto al uso de algunos **biomarcadores** no estudiados hasta el momento en aves (Capítulo 2, daño genotóxico - ensayo del cometa), o en su relación con la exposición a metales (Capítulo 3, respuesta adrenocortical al estrés) (ver también Baos & Blas 2008). Tampoco hasta la fecha se había estudiado lo que un gran número de investigadores demandaba desde tiempo atrás: evaluar las posibles **consecuencias a largo plazo** de la **exposición a contaminantes** durante el **desarrollo** sobre la **reproducción**, de manera **individual** y en **condiciones ambientales** (Capítulo 5).

Aunque los experimentos llevados a cabo en el laboratorio con diversas especies de vertebrados habían demostrado la existencia de estos efectos (Damstra et al. 2002 Quinn et al. 2008), la complejidad de los sistemas naturales (p.ej., interferencias ambientales), y la complicada logística necesaria para estudiarlos hacían que su investigación en campo fuera difícil de abordar. Según la bibliografía revisada, esta es la primera vez que un estudio de este tipo se lleva a cabo en condiciones naturales utilizando aves de larga vida. Los resultados obtenidos demuestran que los contaminantes ambientales (incluso en concentraciones bajas) pueden tener efectos sutiles sobre la reproducción y eficacia biológica de los individuos; efectos que suelen permanecer ocultos a menos que la investigación se prolongue durante años y destine la suficiente cantidad de dinero y esfuerzo para intentar desvelarlos.

A pesar de la naturaleza correlacional de los principales hallazgos de esta tesis, las **implicaciones** que pueden derivarse de sus resultados son **importantes**, fundamentalmente porque la exposición a niveles bajos de una mezcla de metales (y/u otros contaminantes) reproduce el ambiente en el que se mueve la mayor parte de la fauna silvestre, por lo que los **efectos** detectados y sus **consecuencias a largo plazo** podrían estar mucho más **generalizados** de lo imaginable *a priori*. Esto podría llevar a plantearnos si muchas de las respuestas fisiológicas y ecológicas que observamos en la naturaleza no están contaminadas, en el más amplio sentido de la palabra, por los efectos de este tipo de exposiciones que, como se ha visto, son difíciles de detectar mediante estudios a corto o medio plazo, que, por otra parte, son los que habitualmente se vienen realizando.

Esta tesis ilustra también cómo los **seguimientos a largo plazo** de individuos y/o poblaciones expuestas a niveles relativamente bajos de contaminantes son **indispensables** para estudiar sus posibles efectos sobre la eficacia biológica de esos individuos y, por extensión, sobre la dinámica de sus poblaciones. No obstante, a pesar del seguimiento y del trabajo realizados, y aunque ahora comprendamos algo mejor ciertos aspectos relacionados con los efectos a largo plazo de la contaminación ambiental en general, y del vertido de Aznalcóllar en particular, tras años de investigación, y con la información disponible hasta el momento, no podemos afirmar con rotundidad que se hayan producido **cambios** en la **abundancia, estructura y/o función** de las **poblaciones de aves** de Doñana debido a la exposición al vertido. Los datos sobre abundancia de las especies que invernan o se reproducen en el Espacio Natural Doñana no parecen haber sufrido cambios (Ramo et al. 2013; Rendón et al. 2008), y ello pese a que la presencia de algunas de ellas (incluso en gran número, como p.ej., gansos, calamones o fochas) en las zonas directamente cubiertas o afectadas por los lodos y aguas tóxicas conllevara un ele-

vado riesgo de exposición y potenciales efectos. No obstante, tampoco se puede descartar que se haya producido un incremento de las tasas de mortalidad ligado a los efectos del vertido, y que este incremento no haya sido detectado mediante los censos periódicos de poblaciones al no basarse estos en individuos marcados. De hecho, la zona afectada podría haberse mantenido atractiva para la fauna y comportarse temporalmente como un sumidero (Delibes et al. 2009). Tal y como se ha puesto en evidencia en el Capítulo 5, hay efectos que pueden permanecer ocultos y conducir incluso a conclusiones erróneas desde el punto de vista de la conservación si no se realizan estudios a nivel individual y a largo plazo. Además, las estrategias demográficas de algunas especies han podido contribuir a contrarrestar esos posibles efectos, y quizá, enmascararlos. Por ejemplo, la mortalidad causada por los contaminantes puede ser compensada en mayor o menor medida mediante una reducción en las pérdidas naturales dependientes de la densidad. Este fue el caso de lo ocurrido hace algunas décadas en poblaciones de gavilán (*Accipiter nisus*) y de halcón peregrino (*Falco peregrinus*) expuestas a pesticidas organoclorados en Gran Bretaña, donde una menor competencia y un exceso de territorios vacantes permitieron a los individuos jóvenes que habían sobrevivido a la exposición empezar a reproducirse a edades más tempranas de lo habitual, enmascarando por un tiempo el catastrófico declive poblacional. A la larga, el fracaso reproductor no pudo ser totalmente compensado y las poblaciones de ambas especies disminuyeron hasta casi desaparecer en algunas regiones (Newton 1998). En nuestro caso, la probabilidad de supervivencia del milano negro fue analizada en relación con el vertido (comparación antes-después), encontrándose un descenso de este parámetro tras el accidente minero, especialmente acusado en el año 2001, último de la serie analizada (Baos et al. 2003, Anexo en CD). De no estar sujeta a seguimiento científico con marcaje y seguimiento individual, este efecto hubiese pasado desapercibido al no repercutir en cambios apreciables en el tamaño de la población reproductora.

Por último, y partiendo de la cautela que requiere realizar este tipo de afirmaciones, atendiendo, por un lado al papel de **centinelas** o bioindicadores ambientales que otorgamos al principio de esta tesis a las dos especies de aves objeto de estudio y, por otro, a los resultados obtenidos en relación con los efectos aquí estudiados, es razonable pensar que **otras especies** con estrategias vitales próximas podrían haber experimentado **efectos similares**. No obstante, dada la variabilidad interespecífica en cuanto a sensibilidad o susceptibilidad a determinados contaminantes, y la escasez de información experimental sobre sus posibles efectos, sobre todo en los niveles más elevados de organización biológica, es difícil valorar cuáles podrían ser los efectos a largo plazo que la exposición a contaminantes en general, y

al vertido de Aznalcóllar en particular, podría llegar a tener en la fauna silvestre de Doñana. Aun así, los resultados del último capítulo alertan de un potencial efecto en la dinámica poblacional de la cigüeña blanca, difícil de constatar en una especie como ésta debido a los propios mecanismos búfer o amortiguadores que puede ejercer, por ejemplo, la incorporación de individuos procedentes de otros núcleos reproductores (Barbraud et al. 1999). El mismo efecto en otras especies cuyo número de efectivos sea más reducido (p.ej., milano real) o que sufra limitaciones en cuanto a la incorporación de individuos foráneos (p.ej., barreras geográficas, genéticas, etc.), podría tener consecuencias mucho más rápidas y evidentes, y de carácter más grave de cara a la subsistencia de la población. El seguimiento de las poblaciones de aves en Doñana durante los últimos años no ofrece datos que apoyen esta hipótesis (Ramo et al. 2013), pero conviene tenerla en cuenta en futuras investigaciones como posible mecanismo subyacente dentro de la dinámica de poblaciones y de cara a la conservación de especies, sobre todo de aquellas que presentan cierto grado de amenaza y/o sufren otras perturbaciones ambientales, de carácter antropogénico o no. Además, a escala global, sin duda existen problemas similares relacionados con la exposición a contaminantes en otros lugares que, sin embargo, carecen de una vigilancia o seguimiento adecuados. Este seguimiento se hace especialmente necesario allí donde la diversidad de especies y procesos necesiten ser conservados o protegidos.

La protección y **conservación** de la **fauna silvestre** no es, o no sólo es, importante por sí misma, sino porque en el caso de la exposición a contaminantes nos proporciona **centinelas** capaces de reflejar más ampliamente la salud ambiental; la de nuestro entorno, y por ende, **nuestra propia salud** (Burger & Gochfeld 2001). Seres humanos y fauna silvestre compartimos ambientes y redes tróficas (Bornman & Bouwman 2012; Letcher et al. 2010). Las rutas o procesos moleculares y fisiológicos que se han demostrado alterados en respuesta a determinados tóxicos se conservan en gran medida entre los vertebrados (p.ej., un producto químico que es hormonalmente activo en un ave resulta altamente probable que también lo sea en humanos), alertando por igual a científicos y profesionales de la medicina sobre la necesidad de prestar una mayor atención al papel que los contaminantes ambientales desempeñan en la etiología de ciertas enfermedades y/o alteraciones congénitas (Bergman et al. 2013; Colborn et al. 1993; Norris & Carr 2006).

Los resultados del Capítulo 3 respecto a la respuesta inducida al estrés y los niveles de Pb en los pollos de cigüeña precedieron a los encontrados posteriormente en niños de corta edad expuestos a niveles bajos de este mismo metal (Gump et al. 2008). Apelando de nuevo a la cautela que requiere realizar este tipo de afirmaciones, así como a la complejidad e inconvenientes que conlleva la



extrapolación de efectos, los resultados del Capítulo 5 podrían resultar relevantes para las investigaciones relacionadas con el impacto de los contaminantes sobre la reproducción y el comportamiento de los individuos expuestos a contaminantes en etapas tan críticas de la vida como las primeras fases del desarrollo (Bergman et al. 2013).

En cualquier caso, el problema quizá no sea tanto si los contaminantes capaces de desencadenar este tipo de efectos en la fauna silvestre pueden también hacerlo en los seres humanos (ver revisión en Goodhead & Tyler 2008), sino si los **escenarios de exposición** en los que se desenvuelven los **seres humanos** son suficientes para que esto ocurra, como sugiere la cada vez más abundante literatura científica al respecto (p.ej., Bornman & Bouwman 2012; Gump et al. 2008). Con una población creciente y un incremento en el uso, complejidad y diversidad de productos farmacéuticos y otros (p.ej., cosméticos, productos de higiene personal, etc.), estos escenarios son cada vez más numerosos y diversos (p.ej., en el caso de Doñana ver Camacho-Muñoz et al. 2010), dando lugar a **nuevos retos ecotoxicológicos** (Rattner 2009). Ejemplo de ello pueden ser las graves anomalías en el desarrollo encontradas en los peces muestreados en varios ríos británicos debido a la disrupción endocrina (Tyler & Filby 2011), o más recientemente el envenenamiento que de forma secundaria han sufrido las poblaciones de buitres de India y Pakistán por el uso de un medicamento utilizado de forma habitual por los veterinarios para tratar problemas articulares y musculares en el ganado (Oaks & Watson 2011); ejemplos de lo que Beck (1992) llamaba “los riesgos de la modernidad”. La difícil y triste situación de los buitres indios demuestra que a pesar de nuestra mayor conciencia sobre los riesgos que entraña el uso de drogas o productos farmacéuticos y otros químicos de uso industrial, de todas las pruebas o tests previos a su comercialización y de las precauciones que podamos tomar al respecto, es probable que el actual y futuro despliegue de tecnologías químicas tenga graves consecuencias, que estas sean de largo alcance y difícilmente predecibles. Por ello es necesario seguir trabajando en paralelo, para identificar riesgos, y evitarlos o minimizarlos en la medida de lo posible.

RECOMENDACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

Aunque trágicos, los **desastres medioambientales** generan **oportunidades** para investigar la respuesta de los individuos y de las poblaciones ante tales impactos y pueden servir a modo de experimentos “naturales”, únicos para resolver cuestiones que, de otro modo, serían difíciles de abordar. La investigación que aquí se presenta podría servir de ejemplo sobre cómo se puede utilizar un accidente de este tipo para

estudiar los efectos de los contaminantes a niveles bajos, las variaciones interanuales en las respuestas de los biomarcadores, las interacciones entre contaminantes y otros factores de estrés ambiental, o las consecuencias a largo plazo de esos efectos sobre la eficacia biológica de los individuos, aspectos todos ellos de interés para disciplinas como la ecotoxicología y la biología de poblaciones y de conservación. También la gestión medioambiental podría hacer uso de este tipo de experiencias para que en sucesivos vertidos, parte de los fondos destinados a la necesaria restauración del área afectada se inviertan en estudios diseñados para evaluar cómo esos desastres afectan a las poblaciones naturales en su propio ambiente.

En una escala global, un **vertido** puede parecer algo pequeño, local y efímero en comparación con otros problemas medioambientales o de conservación como la deforestación, la acelerada pérdida de especies, el agotamiento de las reservas de agua dulce, el colapso de las pesquerías, el imparable aumento de la población humana y de sus presiones sobre el medio, el deshielo de los polos, el cambio de la química de los océanos o el calentamiento global. Sin embargo, de ellos también se pueden aprender importantes lecciones, no sólo a nivel de prevención, sino también a efectos de un mejor diseño de los estudios necesarios para determinar sus posibles consecuencias y cómo contrarrestarlas o evitarlas. Por ello, y en un contexto más amplio, se mencionan algunas de las **lecciones aprendidas y/o recomendaciones** que surgen de las investigaciones realizadas en esta tesis, para después desarrollar algunos aspectos más ampliamente. Así, sería aconsejable:

- Crear y mantener **bancos de muestras** que permitan realizar análisis retrospectivos sobre la evolución temporal (y/o espacial) tanto de los niveles de contaminantes (conocidos o de nueva síntesis/detección), como de sus posibles efectos, así como, en su caso, de la efectividad de las tareas de limpieza.
- Continuo desarrollo y perfeccionamiento de las **técnicas de monitoreo**, particularmente de técnicas no destructivas y no invasivas (como, p.ej., el muestreo de heces o plumas).
- Desarrollo y perfeccionamiento de **biomarcadores**, tanto generalistas que actúen como “sistemas de alerta temprana”, como específicos que ayuden a establecer relaciones de causalidad en condiciones de campo (donde normalmente el ruido ambiental es importante). En este sentido, sería especialmente interesante hacer uso de las nuevas tecnologías genómicas y proteómicas dentro de las evaluaciones a nivel de población.

- Llevar a cabo **estudios en condiciones controladas** (laboratorio o semi-libertad) que ayuden a establecer relaciones de causalidad.
- Adaptación continua y actualización de técnicas de tratamiento de datos y análisis estadísticos (**modelos**) a los estudios ecotoxicológicos.
- Necesidad de **personal especializado**: i) en el laboratorio, para adaptar y desarrollar la metodología necesaria para el estudio cuantitativo y cualitativo de los contaminantes (y sus posibles efectos), así como para diseñar y llevar a cabo experimentos *ad hoc* en condiciones de cautividad; y ii) en el campo, para identificar y abordar los problemas que puedan surgir antes de que se llegue a una situación crítica. Para ello (sobre todo para la identificación en campo), es necesario establecer unos niveles “normalizados” (niveles de base) de parámetros o indicadores a distintos niveles de organización biológica, para lo que resulta imprescindible un seguimiento continuado en el tiempo o a largo plazo, tanto de esos parámetros como de los factores (bióticos y abióticos) que pueden afectar a su variación (p.ej., dieta, meteorología, etc.).
- Fomentar la **cooperación** entre técnicos, investigadores, asesores y gestores. Ante una situación de emergencia como un vertido tóxico es importante ser capaz de movilizar rápidamente personal y fondos para apoyar la investigación coordinada en campo y laboratorio. Tras identificar una perturbación de estas características, pero también ante cualquier otra que requiera un enfoque multidisciplinar (como es el caso de la mayoría de los estudios ecotoxicológicos), sería recomendable que el conjunto de investigadores incluyera no sólo ecólogos y expertos en fauna silvestre, también químicos ambientales, especialistas en patología veterinaria, toxicología y ciencias de la salud, así como la figura de un coordinador de proyecto/s, capaz de proporcionar una perspectiva más amplia, coordinar y ayudar en las tareas de gestión y facilitar la comunicación interna entre los distintos expertos y externa entre el resto de partes implicadas (autoridades, ciudadanía, etc.).

Un **seguimiento amplio y continuado** en el tiempo de las **poblaciones**, junto con una adecuada **investigación en campo y experimentación en laboratorio** juegan un papel fundamental a la hora de determinar las consecuencias, sobre todo a largo plazo, de la exposición a contaminantes, así como de confirmar esa exposición como la causa u origen de los efectos que pudieran detectarse en las poblaciones, incluyendo una eventual disminución en su número de efectivos. No obstante, el número de casos/estudios documentados respecto a esto último es pequeño ya que

los descensos poblacionales se producen por lo general de forma gradual. Además, retrospectivamente, algunos de los efectos de los contaminantes son difíciles de distinguir de los ocasionados por otros factores de estrés ambiental. Esos efectos pueden ser indirectos (p.ej., a través de cambios en la disponibilidad o calidad del alimento, Eeva et al. 2005); tardíos (respecto al momento de la exposición; es el caso de los llamados efectos latentes); y/o permanecer ocultos o pasar desapercibidos, bien porque no resultan obvios (p.ej., efectos relacionados con la toxicología adrenal), porque se detectan lejos de la fuente de contaminación (p.ej., especies migradoras), o porque son compensados de manera natural (Newton 1998).

Para poder **determinar** o aproximarnos a establecer las **causas** de lo observado en la **naturaleza**, con individuos de vida libre, es de vital importancia llevar a cabo **estudios** con animales en **cautividad** que apoyen los resultados obtenidos en campo, ya que estos resultados pueden verse afectados por factores desconocidos o no controlables. Para ello sería recomendable utilizar especies modelo. Como ejemplo se pueden citar los trabajos realizados con el cernícalo americano (*Falco sparverius*) sobre exposición y efectos a varios contaminantes persistentes (Ferne et al. 2001, 2003, 2006). No obstante, la mayoría de estos trabajos se llevan o se han llevado a cabo utilizando un solo contaminante o tipo de contaminante.

Las **mezclas de contaminantes** son una realidad que, aun siendo compleja, necesita ser explorada, bien en laboratorio o bien en condiciones de semilibertad (p.ej., Alonso-Álvarez et al. 2007; Pikula et al. 2008) para así poder aproximarnos a las causas u origen de los efectos que observamos en campo. Especialmente en el caso de los estudios en condiciones de semilibertad, lo más razonable desde un punto de vista ético y logístico es considerar diseños experimentales en los que la exposición a esas mezclas complejas se produzca a través de la dieta, reflejando esta la cesta de alimentos de la especie o especies objeto de estudio y en los que la exposición a los contaminantes pueda ser medida o estimada. En un futuro sería recomendable, además, que este tipo de experimentos fueran también diseñados para estudiar los efectos combinados o **interacciones** de los **contaminantes** y **otros factores de estrés ambiental** (de carácter antropogénico o no). A este respecto, en esta tesis, y de manera observacional, se ha podido comprobar cómo en el caso de las cigüeñas para una misma concentración de Pb en sangre, los pollos únicos resultantes de procesos de reducción de pollada (y, por tanto, sometidos a un mayor estrés ambiental), mostraron una respuesta adrenocortical al estrés más acusada que los pollos de nidadas múltiples.

En el Capítulo 5 se discutió cómo el patrón alterado de reproducción para las hembras de cigüeña nacidas después del vertido, y expuestas al mismo durante su

desarrollo, podría deberse al fenómeno denominado **inversión terminal** (*terminal investment hypothesis*). Sería conveniente profundizar en esta hipótesis estudiando la posible **relación** entre los **efectos subletales** detectados en **pollos**, esto es, respuesta inmune, daños en el ADN, y parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo óseo, con el **éxito reproductor** futuro de estos **mismos individuos**. Estudios previos demostraron la existencia de una relación negativa entre la respuesta al estrés durante las primeras etapas del desarrollo y la probabilidad de reclutamiento y supervivencia (Blas et al. 2007). En esta línea, el siguiente paso sería estudiar los posibles efectos de la exposición al vertido sobre la **supervivencia** (juvenil y adulta) de cigüeñas y milanos. El hecho de trabajar con especies de larga vida y poblaciones marcadas (y de haber continuado con el seguimiento de campo desde que ocurriera el vertido) posibilita que dichos estudios puedan llevarse a cabo. Los resultados de los análisis preliminares realizados para ambas especies auguran efectos interesantes de explorar.

Por otro lado, aunque los **trabajos** publicados hasta la fecha en cuanto a los **efectos** del **vertido** de **Aznalcóllar** en **seres vivos** son muchos y abarcan casi todos los eslabones de la cadena trófica, la mayor parte de las **muestras** tomadas para realizar esos estudios datan **de hace más de un lustro**. Teniendo en cuenta la distribución residual de los lodos y sedimentos contaminados que aún permanecen en la zona afectada por la riada tóxica y su bioacumulación en especies de distintos grupos taxonómicos (p.ej., Alcorlo et al. 2006; Márquez-Ferrando et al. 2009; Sánchez-Char-di et al. 2009; Tornero et al. 2011), cabe la **posibilidad** de que las aves se hallen aún expuestas a esa **contaminación residual** en su búsqueda de alimento (Martínez-Haro et al. 2013; Mateo et al. 2008). Estudios realizados casi 20 años después del accidente del petrolero Exxon Valdez en las costas de Alaska han demostrado que, pasado ese tiempo se siguen detectando efectos en las poblaciones afectadas por el vertido, y que, por ejemplo, la mortalidad del pato arlequín (*Histrionicus histrionicus*) relacionada con la exposición crónica al crudo del Exxon Valdez se estima superior a la que se registró como consecuencia de la exposición aguda al petróleo en las semanas y meses que siguieron al vertido, período que suele percibirse como el de mayor impacto (Iverson & Esler 2010). En nuestro caso, a esa contaminación residual procedente del vertido habría que añadir la detectada en relación con los contaminantes orgánicos presentes en el medio. Aunque los niveles encontrados hasta la fecha no son, en general, alarmantes, se han medido concentraciones en huevos de cigüeña y milano real susceptibles de provocar efectos adversos en la reproducción y malformaciones en embriones y pollos (Gómara et al. 2008; autores inédito). Por todo ello, sería aconsejable llevar a cabo **nuevos muestreos** que permitan determinar cuál es el estado actual y su posible evolución en el tiempo.

Hasta hace relativamente poco tiempo la atención prestada al **impacto** que la **exposición a contaminantes** ambientales puede provocar sobre la **genética** de las **poblaciones** y sus consecuencias sobre los procesos evolutivos ha sido escasa. Cambios en las frecuencias alélicas o genotípicas causados por selección (p.ej., eliminación de los genotipos sensibles) o en los patrones de dispersión o flujo genético entre poblaciones (convirtiendo algunas zonas contaminadas en sumideros ecológicos, Matson et al. 2006; Theodorakis & Wirgin 2002; Theodorakis et al. 2001), se hallan entre las respuestas genéticas de las poblaciones ante la exposición a contaminantes y constituyen el principal objeto de estudio de la denominada **(eco)toxicología evolutiva** (Coutellec & Barata 2011; Shugart et al. 2010).

Los efectos sobre el comportamiento de los individuos, fisiología y estructura poblacional pueden ser mitigados en pocas generaciones después de la reducción del estrés químico, mientras que las posibles consecuencias genéticas que para la población tiene la exposición a los contaminantes pueden ser más persistentes (Murdoch & Hebert 1994). Las pérdidas de variabilidad genética son especialmente preocupantes porque reducen el potencial adaptativo de las poblaciones frente a un cambio ambiental y por tanto disminuyen la probabilidad de supervivencia de la población tanto a corto como a largo plazo (Alendorf & Leary 1986). Finalmente, los efectos epigenéticos también merecen consideración particular en relación con el impacto evolutivo, puesto que algunas de estas modificaciones inducidas por el ambiente pueden también transmitirse a las siguientes generaciones (Bonduriansky & Day 2009). Aunque se sabe que la exposición a algunos metales (p.ej., As, Zn, Cd) induce cambios epigenéticos (estrés oxidativo-metilación del ADN), aún queda mucha investigación por realizar en torno a la posible relación causal entre los cambios epigenéticos inducidos por la exposición a tóxicos ambientales y sus efectos fenotípicos, así como sobre la persistencia de esos cambios y su transmisión a las siguientes generaciones no expuestas (Vandeghechuchte & Janssen 2011).

En resumen, los contaminantes ambientales pueden afectar a la trayectoria evolutiva de una población a través de múltiples procesos (selección natural, mutación, flujo genético, deriva genética, cambios epigenéticos). La evaluación de los aspectos o parámetros ecotoxicológicos clásicos como biodisponibilidad, rutas de exposición, relaciones dosis/efecto, entre otros, seguirá siendo necesaria, pero podría ser complementada por la investigación en genética molecular (Legler 2010). La disponibilidad de nuevas tecnologías de secuenciación genómica puede ayudar a entender, por ejemplo, las consecuencias funcionales de las modificaciones epigenéticas y diseñar experimentos para determinar los posibles impactos a niveles más elevados de organización biológica. En nuestro caso, este tipo de investigación supondría un valioso complemento a los estudios ya realizados sobre

daño genotóxico, alteraciones fisiológicas y reproducción, ayudando a establecer posibles relaciones causa-efecto (mecanismos) a nivel individual y evaluar efectos potenciales a nivel de población.

Las dificultades que conlleva cuantificar los efectos de los distintos factores de estrés o perturbaciones ambientales a lo largo de la vida de los individuos silvestres pueden limitar los esfuerzos para evaluar los riesgos para las poblaciones. Puesto que los datos empíricos son escasos, los **modelos** poblacionales pueden ser utilizados para tener una idea de la dinámica poblacional, ya que reflejan las influencias ambientales en determinados momentos del ciclo vital (Barnhouse et al. 2007; Morris et al. 2002). Usando la estimación de parámetros y determinadas asunciones debidamente justificadas, los modelos pueden ser utilizados para explorar las interacciones de las perturbaciones de origen antropogénico (p.ej., la contaminación) con otros factores ecológicos como los efectos dependientes de la densidad o cambios ambientales (Gervais et al. 2006; Iverson & Esler 2010; Rattner 2009; Salice et al. 2011). La información recopilada durante el seguimiento de las poblaciones de las dos especies objeto de estudio en esta tesis a lo largo de todos estos años, antes y después del vertido, ofrece una excelente oportunidad para profundizar en esta línea de investigación.

Aunque la opinión pública suele estar de acuerdo con los científicos en subrayar el **valor intrínseco** (*per se*) de nuestros **recursos naturales**, y en la **necesidad de conocerlos para conservarlos**, son los responsables políticos y gestores de esos recursos los que toman las difíciles decisiones sobre las prioridades de financiación. Desafortunadamente, sigue siendo **difícil** reunir **apoyos** para la **investigación** a menos que esté en juego algún interés tangible para “lo humano”. En el caso de los vertidos tóxicos, ese interés puede resultar más evidente. En lo que respecta al vertido minero de Aznalcóllar, los primeros resultados sobre niveles y efectos, principalmente la aparición de pollos de cigüeña con deformaciones, y sus posibles implicaciones tanto para la fauna silvestre como para la salud de las poblaciones asentadas en la zona, hicieron que responsables y gestores consiguieran la financiación necesaria para continuar con las investigaciones a medio plazo, lo que ha permitido la detección de efectos que, de otro modo, habrían pasado inadvertidos. Proyectos como la creación del Corredor Verde del Guadiamar (Carrascal et al. 2008), un pasillo ecológico entre el Espacio Natural Doñana y Sierra Morena, o la recuperación de humedales anteriormente modificados (Proyecto Doñana 2005, García-Novo et al. 2006), encontraron cabida entre las prioridades de gestión.

Por todo ello, y a pesar de las continuas amenazas que se ciernen sobre Doñana, siendo cientos las especies de aves que utilizan este espacio natural para

invernar, reproducirse o como lugar de paso en sus migraciones, el vertido de Aznalcóllar, aun habiendo representado una de las más grandes de esas amenazas sufridas hasta la fecha por este espacio natural, también ha contribuido a mejorar la ciencia y la investigación que en él se vienen realizando desde hace décadas, y por ende, a los científicos que hemos aprendido y nos hemos formado “accidentalmente” por/a pesar de aquel desastre.

REFERENCIAS

- Alcorlo P et al. 2006. The Use of the Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as Indicator of the Bioavailability of Heavy Metals in Environmental Monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Sci Tot Environ* 366(1): 380-390.
- Alendorf FW, Leary RF. 1986. Heterozygosity and Fitness in Natural Populations of Animals. En: *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Soule ME (Ed). Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, pp. 57-76.
- Alonso-Álvarez C et al. 2007. Effects of Acute Exposure to Heavy Fuel Oil from the Prestige Spill on a Seabird. *Aqua Toxicol* 84(1): 103-110.
- Alzaga A et al. 1999. Characterization of Organic Compounds in Soil and Water Affected by Pyrite Tailing Spillage. *Sci Tot Environ* 242(1-3): 167-178.
- Baos R, Blas J. 2008. Adrenal Toxicology in Birds: Environmental Contaminants and the Avian Response to Stress. En: *Adrenal Toxicology*. Harvey PW, Everett DJ, Springall CJ (Eds). *Target Organ Toxicology Series*, Vol. 26. Hayes AW, Thomas JA, Gardner DE (Ser Eds). Informa Healthcare, NY (USA), pp. 257-294.
- Baos R et al. 2003. Niveles de Metales Pesados y Arsénico en las Aves de Doñana y su Entorno tras el Vertido de las Minas de Aznalcóllar. Efecto a Nivel de Individuo e Impacto en las Poblaciones. En: *Ciencia y Restauración del Río Guadiamar: Resultados del Programa de Investigación del Corredor Verde del Guadiamar: 1998-2002*. Consejería de Medio Ambiente-Junta de Andalucía (Ed), pp. 210-225. Disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacionesdigitales/90-513_CIENCIA_Y_RESTAURACION_DEL_RIO_GUADIAMAR/90-513/17_NIVELES_DE_METALES_PESADOS_Y_ARSENICO_EN_LAS_AVES_DE_DONHANA_Y_SU_ENTORNO.PDF
- Baos R et al. 2002. Short-term Adaptation of Microalgae in Highly Stressful Environments: An Experimental Model Analysing the Resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the Heavy Metals Mixture from the Aznalcóllar Mine Spill. *Eur J Phycol* 37(4): 593-600.
- Barbraud C et al. 1999. Populations Dynamics of the White Stork *Ciconia ciconia* in Western France. *Ibis* 141: 469-479.
- Barnhouse L, Munns W, Sorensen M (Eds). 2007. *Population-level Ecological Risk Assessment*. SETAC, Pensacola (FL), USA, pp. 376.
- Beck U. 1992. *Risk Society: Towards a New Modernity*. Sage, London, p 252.
- Benito V et al. 1999. Trace Elements in Blood Collected from Birds Feeding in the Area around Doñana National Park Affected by the Toxic Spill from the Aznalcóllar mine. *Sci Tot Environ* 242: 309-323.
- Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT (Eds). 2013. *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012*. © United Nations Environment Programme and World Health Organization 2013. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/78101>.
- Blas J et al. 2007. Stress Response during Development Predicts Fitness in a Wild, Long Lived Vertebrate. *Proc Nat Acad Sci USA* 104(21): 8880-8884.
- Blas J et al. 2006. Age-related Variation in the Adrenocortical Response to Stress in Nestling White Storks (*Ciconia ciconia*) Supports the Developmental Hypothesis. *Gen Comp Endocrin* 148(2): 172-180.
- Bonduriansky R, Day T. 2009. Nongenetic Inheritance and its Evolutionary Implications. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40: 103-125.

- Bornman MS, Bouwman H. 2012. Environmental Pollutants and Diseases of Sexual Development in Humans and Wildlife in South Africa: Harbingers of Impact on Overall Health? *Reprod Dom Anim* 47(Suppl.4): 327-332.
- Burger J, Gochfeld M. 2001. On Developing Bioindicators for Human and Ecological Health. *Environ Monitor Assess*, 66: 23-46.
- Bustnes JO et al. 2004. Immune Function and Organochlorine Pollutants in Arctic Breeding Glaucous Gulls. *Arch Environ Contam Toxicol* 47: 530-541.
- Calabrese EJ. 2005. Paradigm Lost, Paradigm Found: The Re-emergence of Hormesis as a Fundamental Dose Response Model in the Toxicological Sciences. *Environ Poll* 183(3): 378-411.
- Calow P, Forbes VE. 1998. How Do Physiological Responses to Stress Translate into Ecological and Evolutionary Processes? *Comp Biochem Physiol Part A* 120(1): 11-16.
- Camacho-Muñoz MD et al. 2010. Presence of Pharmaceutically Active Compounds in Doñana Park (Spain) Main Watersheds. *J Hazard Mat* 177(1-3): 1159-1162.
- Carrascal F et al. 2008. *La Restauración Ecológica del Río Guadiamar y el Proyecto del Corredor Verde: La Historia de un Paisaje Emergente*. Consejería de Medio Ambiente-Junta de Andalucía (Ed). Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/porta/webmenuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca?vnextoid=ba437e2f626b91110VgnVCM1000000624e50aRCRD&vnextchannel=96c99950905f4310VgnVCM1000001325e50aRCRD>.
- Chambers JE et al. 2002. Biomarkers as Predictors in Health and Ecological Risk Assessment. *Human Ecol Risk Assess* 8(1): 165-176.
- Cheek AO. 2006. Subtle Sabotage: Endocrine Disruption in Wild Populations. *Rev Biol Trop* 54 (Supl.1): 1-19.
- Colborn T et al. 1993. Developmental Effects of Endocrine-disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environ Health Perspect* 101(5): 378-384.
- Colborn T, Clement C. 1992. *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection*. Princeton Scientific Pub.
- Consejería de Medio Ambiente-Junta de Andalucía (Ed). 2003. *Ciencia y Restauración del Río Guadiamar: Resultados del Programa de Investigación del Corredor Verde del Guadiamar: 1998-2002*. Disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacionesdigitales/90-513_CIENCIA_Y_RESTAURACION_DEL_RIO_GUADIAMAR/90-513.htm
- Coutellec MA, Barata C. 2011. An Introduction to Evolutionary Processes in Ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20: 493-496.
- Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van der Kraak G (Eds). 2002. *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*. Geneva: World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. Disponible en: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en
- Delibes M et al. 2009. Animal Decisions and Conservation: The Recolonization of a Severely Polluted River by the Eurasian Otter. *Anim Conserv* 12(5): 400-407.
- Depledge MH. 1994. The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological Tools. En *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Fossi MC, Leonzio C (Eds.) Lewis Publishers, Boca Raton (FL), USA, pp. 271-295.
- Depledge MH et al. 1993. The Conceptual Basis of the Biomarker Approach. En: *Biomarkers. Research and Application in the Assessment of Environmental Health*. Peakall DB, Shugart LR (Eds). NATO Asis Series. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 15-31.

- Di Giulio RT, Tillit DE. 1999. *Reproductive and Developmental Effects of Contaminants in Oviparous Vertebrates*. SETAC Pub, Pensacola (FL), USA, 447 pp.
- Eeva T et al. 2006a. Environmental Pollution Has Sex-dependent Effects on Local Survival. *Biol Lett* 2: 298-300.
- Eeva T et al. 2006b. Environmental Pollution Affects Genetic Diversity in Wild Bird Populations. *Mut Res* 608: 8-15
- Eeva T et al. 2005. Pollution-related Changes in Diets of Two Insectivorous Passerines. *Oecologia* 145: 629-639.
- Eeva T et al. 2000. Biomarkers and Fluctuating Asymmetry as Indicators of Pollution-induced Stress in Two Hole-nesting Passerines. *Funct Ecol* 14: 235-243.
- Eeva T et al. 1997. Population-related Variation in Food Supply and Breeding Success in Two Hole-nesting Passerines. *Ecology* 78(4): 1120-1131.
- Ellegren H et al. 1997. Fitness Loss and Germline Mutations in Barn Swallows Breeding in Chernobyl. *Nature* 389(9): 593-596.
- Exon JH. 1984. The Immunotoxicity of Selected Environmental Chemicals, Pesticides and Heavy Metals. En: *Chemical Regulation of Immunity in Veterinary Medicine*. Liss, AR, NY, USA, pp. 355-368.
- Fairbrother A et al. 2004. Avian Immunotoxicology. *J Toxicol Environ Health Part B* 7: 105-137.
- Fernie KJ et al. 2006. Changes in the Growth, but not the Survival, of American Kestrels (*Falco sparverius*) Exposed to Environmentally Relevant Polybrominated Diphenyl Ethers. *J Toxicol Environ Health Part A* 69: 1551-1554.
- Fernie KJ et al. 2003. Reproductive Abnormalities, Teratogenicity, and Developmental Problems in American Kestrels (*Falco sparverius*) Exposed to Polychlorinated Biphenyls. *J Toxicol Environ Health Part A* 66: 2089-2103.
- Fernie KJ et al. 2001. In Ovo Exposure to Polychlorinated Biphenyls: Reproductive Effects on Second-generation American Kestrels. *Arch Environ Contam Toxicol* 40: 544-550.
- Forbes VE et al. 2006. The Use and Misuse of Biomarkers in Ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem* 25(1): 272-280.
- Fox GA. 1991. Practical Causal Inference for Ecoepidemiologists. *J Toxicol Environ Health* 33: 359-373.
- Franson JC, Pain DJ. 2011. Lead in Birds. En: *Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue concentrations*. Beyer WN, Meador JP (Eds). 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton (FL), USA, pp. 563-593.
- Gangoso L et al. 2009. Long-term Effects of Lead Poisoning on Bone Mineralization in Vultures Exposed to Ammunition Sources. *Environ Poll* 157(2): 569-574.
- García Novo F, Marín Cabrera C (Eds). 2006. *Doñana Agua y Biosfera*. Doñana 2005, Confederación Hidrográfica del Guadalquivir, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, 354 pp.
- Gervais JA et al. 2006. Interactive Effects of Prey and *p,p'*-DDE on Burrowing Owl Population Dynamics. *Ecol Appl* 16(2): 666-677.
- Gochfeld M. 1997. Factors Influencing Susceptibility to Metals. *Environ Health Perspect* 105 (Suppl.4): 817-822.
- Goldstein M et al. 1999. Monocrotophos-Induced Mass Mortality of Swainson's Hawks in Argentina, 1995-96. *Ecotoxicology* 8(3): 201-214.
- Gómara B et al. 2008. Unexpected High PCB and Total DDT Levels in the Breeding Population of Red Kite (*Milvus milvus*) from Doñana National Park, South-western Spain. *Environ Int* 34(1): 73-78.

- Goodhead RM, Tyler CR. 2009. Endocrine-disrupting Chemicals and Their Environmental Impacts. En: *Organic Pollutants: An Ecotoxicological Perspective*. Walker CH (Ed). CRC Press, Devon, UK, pp. 265-292.
- Gump BB et al. 2008. Low-level Prenatal and Postnatal Blood Lead Exposure and Adrenocortical Responses to Acute Stress in Children. *Environ Health Perspect* 116(2): 249-255.
- Guterman L. 2009. Exxon Valdez Turns 20. *Science* 323: 1558-1559.
- Hagger JA et al. 2006. Biomarkers and Integrated Environmental Risk Assessment: Are There More Questions Than Answers? *Integr Environ Assess Manage* 2(4): 312-329.
- Handel CM et al. 2010. Epizootic of Beak Deformities Among Wild Birds in Alaska: An Emerging Disease in North America? *The Auk* 127(4): 882-898.
- Handy RD et al. 2003. A Proposal for the Use of Biomarkers for the Assessment of Chronic Pollution and in Regulatory Toxicology. *Ecotoxicology* 12: 331-343.
- Head JA et al. 2008. Key Amino Acids in the Aryl Hydrocarbon Receptor Predict Dioxin Sensitivity in Avian Species. *Environ Sci Technol* 42(19): 7535-7541.
- Hugget RJ, Kimerle RA, Mehrle PM Jr, Bergman HL (Eds). 2002. *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis, Boca Raton (FL), USA.
- Iverson SA, Esler D. 2010. Harlequin Duck Population Injury and Recovery Dynamics Following the 1989 Exxon Valdez Oil Spill. *Ecol Appl* 20(7): 1993-2006.
- Iwaniuk AN et al. 2006. The Effects of Environmental Exposure to DDT on the Brain of a Songbird: Changes in Structures Associated with Mating and Song. *Behav Brain Res* 173: 1-10.
- Jiménez B et al. 2000. An Study of the Toxic Equivalents Derived from PCDDs, PCDFs, and Dioxin-like PCBs in Two Bird Species (*Ciconia ciconia* and *Milvus migrans*) Nesting in a Protected Area (Doñana National Park, Spain). *Organohalogen Compounds* 46: 542-545.
- Kendall RJ et al. 1992. American Wigeon Mortality Associated with Turf Application of Diazinon AG500. *J Wild Dis* 28(2): 263-267.
- Lee RF, Anderson JW. 2005. Significance of Cytochrome P450 System Responses and Levels of Bile Fluorescent Aromatic Compounds in Marine Wildlife Following Oil Spills. *Mar Poll Bull* 50(7): 705-723.
- Legler J. 2010. Epigenetics: An Emerging Field in Environmental Toxicology. *Integr Environ Assess Manage* 6(2): 314-315.
- Letcher R et al. 2010. Exposure and Effects Assessment of Persistent Organohalogen Contaminants in Arctic Wildlife and Fish. *Sci Tot Environ* 408(15): 2995-3043.
- Lilienfeld AM, Lilienfeld AB. 1980. *Foundations of Epidemiology*. 2nd Ed. Oxford University Press, NY, USA.
- Ludwig JP et al. 1995. Evaluation of the Effects of Toxic Chemicals in Great Lakes Cormorants: Has Causality Been Established? *Colon Waterbirds* 18(Special Issue): 60-69.
- Márquez-Ferrando R et al. 2009. Bioaccumulation of Heavy Metals in the Lizard *Psammodromus algerius* After a Tailing-Dam Collapse in Aznalcóllar (Southwest Spain). *Arch Environ Contam Toxicol* 56(2): 276-285.
- Martín-Díaz M et al. 2008. Integrative Sediment Quality Assessment Using a Biomarker Approach: Review of 3 Years of Field Research. *Cell Biol Toxicol* 24(6): 513-526.
- Martínez-Haro M et al. 2013. Monitoring of Pb Exposure in Waterfowl Ten Years after a Mine Spill through the Use of Noninvasive Sampling. *PLoS ONE* 8(2): art. n° e57295.
- Mateo R et al. 2008. Altered Porphyrin Excretion and Histopathology of Greylag Geese (*Anser anser*) Exposed to Soil Contaminated with Lead and Arsenic in the Guadalquivir Marshes, Southwestern Spain. *Environ Toxicol Chem* 25(1): 203-212.

- Matson CW et al. 2006. Evolutionary Toxicology: Population-level Effects of Chronic Contaminant Exposure on the Marsh Frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan. *Environ Health Perspect* 144(4): 547-552.
- Matthiessen P, Gibbs PE. 1998. Critical Appraisal of the Evidence for Tributyltin-mediated Endocrine Disruption in Mollusks. *Environ Toxicol Chem* 17(1): 37-43.
- McCarthy JF, Shugart LR (Eds). 1990. *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis, Boca Raton (FL), USA.
- Meharg AA et al. 2002. Isotopic Identification of Sources of Lead Contamination for White Stork (*Ciconia ciconia*) in a Marshland Ecosystem (Doñana, S.W. Spain). *Sci Tot Environ* 300: 81-86.
- Miles AK et al. 2007. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure in Steller's Eiders (*Polysticta stelleri*) and Harlequin Ducks (*Histrionicus histrionicus*) in the Eastern Aleutian Islands, Alaska, USA. *Environ Toxicol Chem* 26(12): 2694-2703.
- Moore MN et al. 2004. An Integrated Biomarker-based Strategy for Ecotoxicological Evaluation of Risk in Environmental Management. *Mut Res* 552(1-2): 247-268.
- Morris W, Doak D (Eds). 2002. *Quantitative Conservation Biology*. Sinauer Associates, Sunderland (MA), USA, pp. 480.
- Morrissey CA et al. 2010. Diet Shifts during Egg Laying: Implications for Measuring Contaminants in Bird Eggs. *Environ Poll* 158(2): 447-454.
- Muñoz-Arnanz J et al. 2011a. Dechlorane Plus and Possible Degradation Products in White Stork Eggs from Spain. *Environ Int* 37(7): 1164-1168.
- Muñoz-Arnanz J et al. 2011b. Predominance of BDE-209 and Other Higher Brominated Diphenyl Ethers in Eggs of White Stork (*Ciconia ciconia*) Colonies from Spain. *Environ Int* 37(3): 572-576.
- Murdoch MH, Hebert PDN. 1994. Mitochondrial DNA Diversity of Brown Bullhead from Contaminated and Relatively Pristine Sites in the Great Lakes. *Environ Toxicol Chem* 13: 1281-1289.
- Newton I. 1998. Pesticides and Pollutants. En: *Population Limitation in Birds*. Academic Press, San Diego (CA), USA, pp. 407-447.
- Norris DO. 2000. Endocrine Disruptors of the Stress Axis in Natural Populations: How Can We Tell? *Am Zool* 40: 393-401.
- Norris DO, Carr JA (Eds). 2006. *Endocrine Disruption. Biological Bases for Health Effects in Wildlife and Humans*. Oxford University Press, NY, USA. 477 pp.
- Oaks JL, Watson RT. 2011. South Asian Vultures in Crisis: Environmental Contamination with a Pharmaceutical. En: *Wildlife Ecotoxicology: Forensic Approaches*, Emerging Topics in Ecotoxicology 3. Elliott JE, Bishop C, Morrissey C (Eds), doi 10.1007/978-0-387-89432-4_5, Springer Science+Business Media, LLC, pp. 413-441.
- Pastor N et al. 2004. A 4 Year Follow-up Analysis of Genotoxic Damage in Birds of the Doñana Area (South West Spain) in the Wake of the 1998 Mining Waste Spill. *Mutagenesis* 19(1): 61-65.
- Pastor N et al. 2001. Assessment of Genotoxic Damage by the Comet Assay in White Storks (*Ciconia ciconia*) After the Doñana Ecological Disaster. *Mutagenesis* 16(3): 219-223.
- Peakall D, Burger J. 2003. Methodologies for Assessing Exposure to Metals: Speciation, Bioavailability of Metals, and Ecological Host Factors. *Ecotox Environ Saf* 56: 110-121.
- Peterson CH et al. 2003. Long-term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science* 302: 2082-2086.

- Pikula J et al. 2008. Effects of Co-exposure to Cyanobacterial Biomass, Lead and Immunological Challenge in Japanese Quails. *Toxicol Lett* 180(Suppl.1): S197-S197.
- Quinn MJ Jr et al. 2008. Consequences of In Ovo Exposure to *p,p'*-DDE on Reproductive Development and Function in Japanese Quail. *Horm Behav* 53(1): 249-253.
- Rainio MI et al. 2013. Oxidative Status in Nestlings of Three Small Passerine Species Exposed to Metal Pollution. *Sci Tot Environ* 454/455: 466-473.
- Ramo C et al. 2013. Long-term Population Trends of Colonial Wading Birds Breeding in Doñana (SW Spain) in Relation to Environmental and Anthropogenic Factors. *Ardeola* 60(2): 305-326.
- Rattner B. 2009. History of Wildlife Toxicology. *Ecotoxicology* 18(7): 773-783.
- Rauschenberger RH et al. 2007. Parental Exposure to Pesticides and Poor Clutch Viability in American Alligators. *Environ Sci Technol* 41: 5559-5563.
- Rendón MA et al. 2008. Status, Distribution and Long-term Changes in the Waterbird Community Wintering in Doñana, South-west Spain. *Biol Conserv* 141(5): 1371-1388.
- Rowe CL et al. 2001. Integrating Individual-based Indices of Contaminant Effects. How Multiple Sublethal Effects May Ultimately Reduce Amphibian Recruitment from a Contaminated Breeding Site. *The Sci World* 1: 703-712.
- Salice CJ et al. 2011. Multiple Stressors and Complex Life Cycles: Insights from a Population-level Assessment of Breeding Site Contamination and Terrestrial Habitat Loss in an Amphibian. *Environ Toxicol Chem* 30(12): 2874-2882.
- Sánchez-Chardi A et al. 2009. Metals in Liver and Kidneys and the Effects of Chronic Exposure to Pyrite Mine Pollution in the Shrew *Crocidura russula* Inhabiting the Protected Wetland of Doñana. *Chemosphere* 76(3): 387-394.
- Scanes CG, McNabb FMA. 2003. Avian Models for Research in Toxicology and Endocrine Disruption. *Avian Poult Biol Rev* 14(1): 21-52.
- Shugart LR et al. 2010. Evolutionary Toxicology. En: *Molecular Approaches in Natural Resource Conservation and Management*. De Woody, JA, Bickman JW, Michler CH, Nichols KM, Rhodes OE, Woeste KW (Eds). Cambridge University Press, NY, USA, pp. 320-362.
- Smits JEG, Baos R. 2005. Evaluation of the Antibody Mediated Immune Response in Nestling American Kestrels (*Falco sparverius*). *Develop Comp Immunol* 29(2): 161-170.
- Smits JEG et al. 2005. Skeletal Pathology in White Storks (*Ciconia ciconia*) associated with heavy metal contamination in Southwestern Spain. *Toxicol Pathol* 33(4): 441-448.
- Spencer KA et al. 2010. Then versus Now: Effect of Developmental and Current Environmental Condition on Incubation Effort in Birds. *Behav Ecol* 21: 999-1004.
- Tella JL et al. 2003. *Efectos del Vertido Tóxico de Aznalcóllar sobre la Cigüeña Blanca, los Anseriformes y el Milano Negro en Doñana*. Informe Final. Convenio de Colaboración entre la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). 146 pp.
- Theodorakis CW, Wirgin I. 2002. Genetic Responses as Population Level Biomarkers of Stress in Aquatic Ecosystems. En: *Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Health*. Adams SM (Ed). American Fisheries Society, NY, USA, pp. 147-186.
- Theodorakis CW et al. 2001. Integration of Genotoxicity and Population Genetic Analyses in Kangaroo Rats (*Dipodomys merriami*) Exposed to Radionuclide Contamination at the Nevada Test Site. *Environ Toxicol Chem* 20: 317-326.
- Tornero V et al. 2011. Following the Aznalcóllar Toxic Spill. *Environ Res* 111(8): 1033-1036.

- Trust KA et al. 1990. Effects of Ingested Lead on Antibody Production in Mallards (*Anas platyrhynchos*). *J Wild Dis* 26(3): 316-322.
- Tyler CR, Filby AL. 2011. Feminized Fish, Environmental Estrogens, and Wastewater Effluents in English Rivers. En: *Wildlife Ecotoxicology: Forensic Approaches*, Emerging Topics in Ecotoxicology 3. Elliott JE, Bishop C, Morrissey C (Eds), doi 10.1007/978-0-387-89432-4_5, Springer Science+Business Media, LLC, pp. 383-412.
- Vandeghechuchte MB, Janssen CR. 2011. Epigenetics and its Implications for Ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20: 607-624.
- Wada H et al. 2009. Suppressed Adrenocortical Responses and Thyroid Hormone Levels in Birds near a Mercury-contaminated River. *Environ Sci Technol* 43(15): 6031-6038.
- Wiens JA et al. 2004. Changing Habitat and Habitat Use by Birds after the Exxon Valdez Oil Spill, 1989-2001. *Ecol Appl* 14(6): 1806-1825.
- Woodward RL et al. 2011. Abnormal Alligators and Organochlorine Pesticides in Lake Apopka, Florida. En: *Wildlife Ecotoxicology: Forensic Approaches*, Emerging Topics in Ecotoxicology 3. Elliott JE, Bishop C, Morrissey C (Eds), doi 10.1007/978-0-387-89432-4_5, Springer Science+Business Media, LLC, pp. 153-187.

CONCLUSIONES



- 1/ Esta tesis abordó las consecuencias del vertido tóxico de la mina de Aznalcóllar sobre las aves de Doñana y su entorno, utilizando como especies centinelas la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) y el milano negro (*Milvus migrans*). El estudio de biomarcadores moleculares, bioquímicos, fisiológicos y ecológicos, junto con el análisis de metales en sangre proporcionó un sistema de evaluación integrada para determinar la biodisponibilidad, bioacumulación y efectos ecotoxicológicos a corto, medio y largo plazo de estos contaminantes en aves.
- 2/ Los niveles medios de Pb, Cd, Zn, Cu y As en sangre de cigüeña blanca y milano negro mostraron una tendencia a disminuir durante el período de estudio (1999-2003), situándose en general por debajo de los encontrados en la bibliografía para las mismas u otras especies en escenarios conocidos de exposición a estos contaminantes, así como de los umbrales establecidos como susceptibles de causar efectos subletales en aves. Los niveles de Cd en sangre de milano negro no mostraron una disminución temporal, aunque fueron inferiores a los encontrados para esta especie en otras zonas de estudio.
- 3/ La respuesta inmune celular de las cigüeñas se vio afectada negativamente por la concentración de Cu en sangre. Ninguno de los otros metales estudiados estuvo relacionado con este biomarcador a lo largo de los cuatro años de estudio (1999, 2001-2003). La asociación entre la respuesta inmune celular y la exposición al vertido (niveles de metales) mostró una importante variación interanual, resaltando la importancia de prolongar los estudios durante varios años para poder evaluar relaciones causales.
- 4/ Las relaciones entre el daño en el ADN y los niveles de metales en sangre variaron entre especies y entre años sin un patrón consistente, probablemente debido a la presencia en el medio de otros agentes genotóxicos o factores de estrés ambiental. La condición física de los pollos (en el caso del milano negro) modificó el efecto genotóxico de algunos metales, como el Cd, siendo los individuos más débiles los que acusaron mayor daño en respuesta a este metal.

- 5 / En las cigüeñas, los niveles de metales en sangre no estuvieron relacionados con los de las hormonas tiroideas T_3 y T_4 . Tampoco se detectaron efectos de los metales en los niveles de corticosterona basal. En cambio, la respuesta inducida al estrés estuvo positivamente relacionada con la concentración de Pb, y más intensamente en el caso de los pollos que habían experimentado adicionalmente otro tipo de estrés ambiental. Este resultado subraya la importancia de considerar la interacción entre los contaminantes y otros factores de estrés.
- 6 / La utilización de un protocolo estandarizado de captura y manejo resulta una mejor aproximación para evaluar la respuesta al estrés que los niveles de corticosterona plasmática medidos de manera puntual y aislada tras la captura de los individuos (corticosterona basal). La medición de esta respuesta destaca como un biomarcador útil de la exposición y potenciales efectos adversos de los metales en la fauna silvestre.
- 7 / Las deformaciones detectadas tras el vertido en los pollos de cigüeña de la Dehesa de Abajo estuvieron relacionadas con un metabolismo óseo alterado en lo que respecta a los niveles de Ca y, especialmente de P. Incluso en ausencia de deformaciones, los pollos de este núcleo reproductor se mostraron incapaces de regular los niveles de P, siendo este efecto más acusado en los pollos más pequeños o de menor edad.
- 8 / Los niveles de fosfatasa alcalina (isoenzima ósea) en los pollos de cigüeña variaron con la edad y con la presencia de deformaciones. En los pollos de menor edad, los niveles de esta enzima fueron inferiores en aves deformes, mientras que en los pollos de mayor edad (próximos a volar del nido) los niveles de fosfatasa alcalina fueron superiores en los individuos con deformaciones. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el proceso de mineralización ósea, más retrasado en el caso de los pollos deformes.
- 9 / Las hembras de cigüeña expuestas al vertido durante su desarrollo mostraron un patrón alterado de reproducción dependiente de la edad, con una productividad inusualmente elevada durante sus primeros episodios de reproducción seguida de una aparente prematura senescencia reproductiva. El coste de los efectos subletales experimentados durante el desarrollo (asociado a la exposición a metales, incluso a niveles bajos) se postula entre los factores que determinaron este patrón, consistente con mecanismos de inversión terminal (*terminal investment hypothesis*).

- 10 / Los biomarcadores estudiados a corto y medio plazo se revelan en su conjunto como un sistema de alerta temprana útil para detectar efectos a más largo plazo de los contaminantes sobre la biología de las aves. La investigación realizada en esta tesis muestra, por primera vez en condiciones naturales, que la exposición a contaminantes durante las primeras etapas del desarrollo, incluso a niveles bajos, puede afectar a la eficacia biológica de los individuos. Este resultado pone de manifiesto el riesgo que conllevan las evaluaciones basadas exclusivamente en estudios realizados a corto y medio plazo, y la necesidad de seguimientos prolongados en el tiempo para una correcta valoración del impacto real de la exposición a contaminantes sobre las poblaciones de fauna silvestre.
- 11 / El vertido de la mina de Aznalcóllar constituye el origen más probable de las alteraciones detectadas en cigüeñas y milanos. No obstante, no se descarta que estas anomalías pudieran resultar de la exposición conjunta a los tóxicos del vertido minero y de otros contaminantes vinculados a la actividad industrial y agrícola en los alrededores del Espacio Natural Doñana.

AGRADECIMIENTOS



Muchas han sido las instituciones y personas que han participado de una u otra forma en este proyecto. A todos ellos he ido dedicando mis agradecimientos en los diferentes capítulos-artículos que forman esta tesis pero, aunque esta vez sí se puede decir que “son todos los que están”, también es cierto que “no están todos los que son”; esta tesis no habría sido posible sin el esfuerzo y el trabajo, el interés y la dedicación de muchos voluntarios, estudiantes, técnicos, investigadores, y personal de apoyo a la investigación (informática, administración, biblioteca, mantenimiento, etc.) que ofrecieron su tiempo, conocimientos y experiencia para que este proyecto pudiera llevarse a cabo. Sería casi imposible, sobre todo después del largo tiempo transcurrido (“todo dura siempre un poco más de lo que debería”, J. Cortázar), nombrar a cada uno de los que aportaron su granito de arena, profesional y/o emocionalmente para poder llegar hasta aquí. Por ello, y para evitar el riesgo de omitir algún nombre, simplemente decir que espero que cada uno de vosotros, si alguna vez llegáis a leer esta tesis o los artículos que forman parte de ella, podáis, de alguna manera, sentirlos satisfechos del trabajo realizado.


A todos los que, en la forma que sea, habéis estado presentes en este largo “viaje”, y especialmente a aquellos que me han acompañado en el último y accidentado tramo del camino... GRACIAS.



A modo de Epílogo...

Este “viaje”, no exento de dificultades, a lo largo de más de una década ha sido emocionante a veces, estimulante otras, complejo siempre, pero por encima de todo ha permanecido la sensación de que era útil, de que “servía para algo”. Quizá en este caso simplemente era más fácil identificar un interés para con “lo humano” en un área, la biología de la conservación, en la que en ocasiones resulta complicado explicar (en ocasiones, “justificar”) por qué es necesario estudiar aquello que estudiamos. Más allá del propio vertido y desastre ecológico, de los llamados accidentes medioambientales, que deberíamos intentar evitar siempre, está el hecho de tomar conciencia de la necesidad de conocer y entender mejor los riesgos a los que todos nos hayamos expuestos al vivir en una sociedad estrechamente vinculada al uso de productos y actividades que, al tiempo que han sido creados o ideados para facilitarnos la vida, constituyen una de sus principales amenazas, directa o indirectamente, a corto, medio y, sobre todo, a largo plazo.

Espero que este trabajo permita reflexionar sobre la vulnerabilidad de espacios y especies que, aun gozando de la mayor protección medioambiental, están irremediablemente expuestos, como todos nosotros por otro lado, a los riesgos de la sociedad industrial y tecnológica en la que vivimos.



“We still talk in terms of conquest: We still haven’t become mature enough to think of ourselves as only a tiny part of a vast and incredible universe. Man’s attitude toward nature today is critically important, simply because we have acquired a fateful power to alter and destroy nature. But man is part of nature, and his war against nature is inevitably a war against himself. We in this generation must come to terms with nature, and I think we’re challenged as mankind has never been challenged before to prove our maturity and our mastery –not of nature, but of ourselves”.

“Silent Spring”

Rachel Carson, 1962





*Hasta aquí he llegado
desde aquí he partido
un camino sin descanso
que buscó dónde nacer
antes de haber nacido*

A. Vega, 2009

Créditos de Fotografías

Pág. 2-3 /	JM. Terrero
Pág. 10-11 /	JM. Terrero
Pág. 16 /	Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía
Pág. 28 (sup.) /	Banco Audiovisual CSIC-Andalucía
Pág. 28 (inf.)	J. Blas
Pág. 40 /	GR. Bortolotti
Pág. 46 /	Banco Audiovisual CSIC-Andalucía
Pág. 48 /	Banco Audiovisual CSIC-Andalucía
Pág. 50 /	Banco Audiovisual CSIC-Andalucía
Pág. 52 (sup.) /	J. Blas
Pág. 52 (inf.) /	Banco Audiovisual CSIC-Andalucía
Pág. 56 /	J. Blas
Pág. 62 /	J. Blas
Pág. 72 /	J. Blas
Pág. 88 (sup. izda.) /	J. Blas
Pág. 88 (inf. izda.) /	JM. Terrero
Pág. 88 (dcha.) /	R. Baos
Pág. 106 (sup. izda.) /	Banco Audiovisual CSIC-Andalucía
Pág. 106 (sup. dcha.) /	J. Blas
Pág. 106 (inf.) /	JM. Terrero
Pág. 122 (sup. izda.) /	J. Blas
Pág. 122 (sup. dcha.) /	Banco Audiovisual CSIC-Andalucía
Pág. 138 /	Banco Audiovisual CSIC-Andalucía
Pág. 154 /	G. García
Pág. 162 /	JM. Terrero
Pág. 166 /	J. Blas
Pág. 178 /	J. Blas
Pág. 196 /	J. Blas
Pág. 202 /	G. García
Pág. 204-205 /	Banco Audiovisual CSIC-Andalucía
Pág. 206-207 /	R. Baos